



Facultad de Veterinaria
Universidad Zaragoza



Trabajo Fin de Máster en Calidad, Seguridad y Tecnología de los Alimentos

Estudio de los factores que inciden en la formación de aldehídos de Strecker en
la fermentación alcohólica

Study of the factors affecting Strecker aldehydes formation during alcoholic
fermentation

Autor

Ángel Manuel Aragón Capone

Directores

Mónica Bueno Fernández
Vicente Ferreira González

Facultad de Veterinaria

2019-2020

A todos mis compañeros y compañeras del LAAE, gracias por ayudarme a aprender y mejorar cada día. En especial a Mónica por su infinita paciencia, por resolverme tantos quebraderos de cabeza y por todo el apoyo que me ha dado, sin el cual el trabajo no habría sido posible.

A todos mis profesores, por haber colaborado conmigo en construir día a día, mes a mes y año a año un sueño que culmina con este trabajo.

A mi familia, por haberme permitido encontrar un ejemplo de motivación, esfuerzo y apoyo sin salir de casa.

Gracias a todos.

Resumen

Uno de los problemas que más afecta a la calidad sensorial del vino, es la aparición durante el envejecimiento de notas de oxidación no deseadas, recordando patata hervida, miel, fruta pasa o malta tostada, y atribuidas a los aldehídos de Strecker. Éstos forman con el SO₂ unas uniones estables, químicamente conocidas como α -hidroxialquilsulfonatos, que al ser no volátiles, son inodoras, por lo que pueden acumularse a lo largo de la vinificación sin ser detectadas. Sin embargo, la reversibilidad de estas uniones provoca que los aldehídos de Strecker se liberarán con el paso del tiempo causando un problema aromático cuyo origen será con frecuencia atribuido erróneamente a la oxidación en botella.

Aunque la implicación de los aldehídos de Strecker en la pérdida de calidad del vino es conocida desde hace tiempo, no se ha esclarecido cuál de las diferentes rutas propuestas para su formación es la de mayor importancia, lo que dificulta solventar el problema.

En el presente trabajo se pretende estudiar su formación durante la fermentación alcohólica y la influencia del SO₂. Por ello se realizó la fermentación alcohólica de un mosto sintético empleando diferentes cepas de *Saccharomyces Cerevisiae* y diferentes cantidades de SO₂ inicial con el fin de evaluar la influencia de ambos factores y de su interacción sobre diferentes parámetros del vino final. Parámetros analizados incluyeron acidez volátil, azúcares reductores, SO₂ libre, combinado y total, aldehídos de Strecker, sus respectivos alcoholes y los correspondientes cocientes aldehído/alcohol.

Los fermentados obtenidos tuvieron concentraciones de aldehídos totales similares a las observadas en vinos comerciales, lo que permite concluir que la formación fermentativa mediante la conocida como Ruta de Ehrlich es mucho más importante en la formación de aldehídos de Strecker que las vías químicas de formación durante la oxidación, como la desaminación oxidativa de aminoácidos (degradación de Strecker) o la peroxidación directa de alcoholes.

En general, el factor cepa de levadura resultó ser determinante en las concentraciones, tanto de aldehídos como de alcoholes, lo que lo señala como un factor crítico que deberá ser abordado con más detalle en el futuro. El efecto del SO₂ fue evidenciado con más claridad cuando se estudiaron los cocientes aldehído/alcohol, que se incrementaron de manera significativa en las muestras con mayores cantidades de SO₂ al inicio de la fermentación. En los casos en los que el SO₂ no resultó significativo, sí lo fueron el factor cepa o la interacción cepa-SO₂.

Abstract

One of the most persistent problems affecting wine quality is the appearance of undesirable notes during aging, such as boiled potato, honey, dried fruit or roasted malt, caused by Strecker aldehydes. These compounds form stable unions with SO₂, chemically known as α-hydroxyalkylsulfonates. These adducts are non-volatile, and hence odorless, which makes it possible its accumulation during winemaking without notice. However, the reversibility of these adducts will lead to the release of aldehydes over time causing an aromatic problem, which most surely, will be erroneously attributed to oxidation in the bottle.

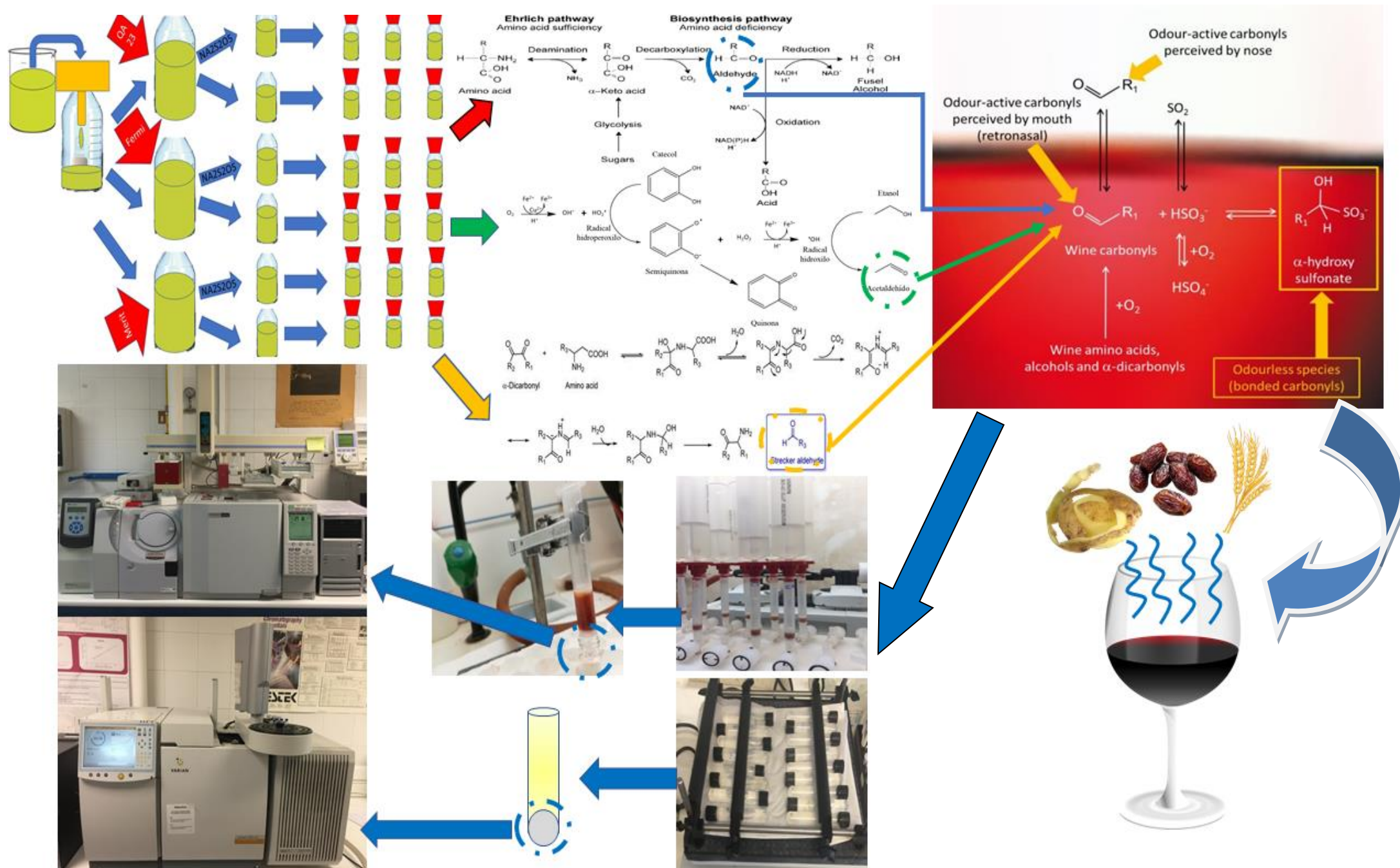
Although the relevance of Strecker aldehydes on wine deterioration has been known from years, it is still unclear which one of the different possible formation pathways is the most important, which complicates the correct handling of the problem.

The present work addresses the formation of these compounds during alcoholic fermentation and examines the possible influence of SO₂. For this synthetic musts containing different initial levels of SO₂ were fermented using different strains of *Saccharomyces Cerevisiae* in order to assess the influence of both factors and of their interaction on different parameters of the final wine. Parameters measured were volatile acidity, reducing sugars, free, combined and total SO₂, Strecker aldehydes, their respective alcohols and the corresponding ratios aldehyde/alcohol.

As the so obtained ferments contained levels of Strecker aldehydes similar to those found in commercial wines, it is possible to conclude that the fermentative formation of these compounds, through the Ehrlich Pathway, is much more relevant than the chemical ways of formation during wine oxidation, such as the oxidative deamination of aldehydes (Strecker degradation) or the direct peroxidation of alcohols.

In general, the factor strain was determinant in the levels of both aldehydes and alcohols, which strongly suggests the interest to address this issue more carefully in future studies. The effect of SO₂ became most evident when the ratios aldehyde/alcohol were considered. These ratios significantly increased in the samples containing higher initial levels of SO₂. Strain or interaction between strain and SO₂ were significant in those cases where SO₂ factor was not.

Resumen Gráfico / Graphical Abstract



Listado de abreviaturas

- ANOVA: Análisis de varianza (Analysis of Variance)
- DSR: Desviación Estándar Relativa (Relative Standard Deviation)
- EI: Impacto Electrónico (Electronic Impact)
- GC-MS: Cromatografía de gases acoplada a Espectrometría de Masas (Gas Chromatography-Mass Spectrometry).
- FID: Detector de Ionización de Llama (Flame Ionization Detector)
- IT: Trampa de Iones (Ion Trap)
- LAEE: Laboratorio de Análisis del Aroma y Enología
- LSD: Mínima Diferencia Significativa (Least Significant Difference)
- OAV: Valor de la Actividad Aromática (Odor Activity Value)
- OIV: Organización Internacional de la Viña y el Vino
- Q: Cuadripolo (Quadrupole)
- PFBHA: *o*-(2,3,4,5,6-pentafluorobencil)hidroxilamina
- SIM: Monitorización del Ion Seleccionado (Selected Ion Monitoring)
- SPE: Extracción en Fase Sólida (Solid Phase Extraction)

ÍNDICE

Introducción y objetivos	1
1.1 El vino en la historia.....	1
1.2 El vino en la actualidad	1
1.2.1 Vino y salud.....	1
1.2.2 La economía del vino en España y el mundo	2
1.3 Aroma en la calidad sensorial del vino.....	3
1.3.1 La importancia del aroma de los aldehídos en el vino.....	3
1.4 Rutas de formación de los aldehídos de Strecker en el vino	4
1.5 Relación del SO ₂ con los aldehídos en el vino	9
1.6 Objetivos e importancia del estudio.....	10
Material y métodos	11
2.1 Materiales y reactivos.....	11
2.2 Elaboración del mosto sintético y diseño de la fermentación	13
2.2.1 Mosto sintético.....	13
Fermentación: Cepas y SO ₂	14
2.2.2 Registro de datos durante la fermentación	15
2.3 Determinación de azúcares reductores: Estabilidad microbiológica de los vinos	16
2.4 Determinación de la acidez volátil: Método García-Tena.....	16
2.5 Determinación de SO ₂ libre, combinado y total: Método Rankine.....	17
2.6 Determinación de alcoholes derivados o superiores	18
2.6.1 Extracción de los alcoholes de la muestra	18
2.6.2 Análisis por GC-MS (Cromatografía de gases acoplada a Espectrometría de Masas)	19
2.6.3 Cuantificación de los alcoholes superiores.....	19
2.7 Determinación de aldehídos totales.....	20
2.7.1 Equilibrado de los estándares internos con la matriz y derivatización	20
2.7.2 Extracción de las oximas por SPE (Extracción en Fase Sólida).....	20
2.7.3 Análisis de las oximas por GC-MS	21
2.7.4 Cuantificación de las oximas	22
2.8 Tratamiento de datos	22
Resultados y discusión.....	24
3.1 Evolución de las fermentaciones.....	24
3.2 Azúcares reductores	26
3.3 Acidez volátil	27
3.4 SO ₂ libre, combinado y total	29

3.5 Alcoholes derivados o superiores.....	30
3.5.1 Optimización del Split y programa de temperaturas	30
3.5.2 Cuantificación de alcoholes.....	31
3.6 Aldehídos totales	35
3.6.1 Complejidad del análisis y detectabilidad de los aldehídos	35
3.6.2 Aldehídos de Strecker totales en la fermentación alcohólica	35
3.6.3 Equilibrio aldehído-alcohol en función de las condiciones cepa-SO ₂ iniciales	38
Conclusiones	41
Bibliografía	42

Introducción y objetivos

1.1 El vino en la historia

Para entender el objetivo principal del trabajo, previamente es fundamental conocer la importancia del vino en la actualidad y la estrecha relación que ha tenido éste con diferentes sociedades y civilizaciones a lo largo de la historia. Desde sus orígenes datados alrededor del año 8000 a.C., en la actual Georgia (Salopek, 2015), hasta su llegada a la Península Ibérica, estimada entre los siglos VIII-VI a.C. proveniente de las culturas fenicias y púnicas (Celestino & Blánquez, 2007), el cultivo de la vid y la elaboración del vino han sido vehículos de la civilización en el Mediterráneo. (Johnson, 1989).

Menciones al vino aparecen en civilizaciones como la del Antiguo Egipto sobre el año 3100 a.C. (Murray, 1999). Posteriormente en Grecia, en el siglo VIII a.C., no sólo se le asocia a la divinidad Dionisio (Standage, 2006), sino que además el propio Hipócrates, padre de la medicina Occidental, comenzó a estudiar los beneficios del consumo de vino en cuerpo y mente (Jouanna, 2012). De esta forma, el vino no deja de aparecer en momentos clave de la historia de las civilizaciones como la colonización del Nuevo Mundo (Winkler *et al.*, 1974). Además, distintos dirigentes mundiales han ayudado a propagar los vinos de diferentes zonas. Napoleón Bonaparte prefería el vino Pinot Noir Gevrey-Chambertin (Hazlitt, 1852) mientras que a Thomas Jefferson le gustaban los vinos de Burdeos y de Borgoña (Hailman, 2006); Stalin sin embargo, se inclinaba por el Khvanchkara georgiano, que además estuvo presente en la Conferencia de Yalta con Churchill y Roosevelt (Mack & Surina, 2005).

1.2 El vino en la actualidad

1.2.1 Vino y salud

Como ya se ha comentado, el consumo del vino ha sido popular durante siglos por todo el mundo. Sin embargo, en las últimas décadas, gran variedad de estudios han demostrado las ventajas del consumo moderado de vino en nuestra salud, algunos de ellos son: la reducción del riesgo de sufrir enfermedades cardiovasculares (Leikert *et al.*, 2002), cáncer (Middleton Jr, Kandaswami & Theoharides, 2000) o enfermedades neurodegenerativas (Sun *et al.*, 2008) entre otras. Este hecho ha influido en el consumo, pero también ha tenido gran influencia en la repercusión económica de países productores de uva y elaboradores de vino como España.

1.2.2 La economía del vino en España y el mundo

La OIV (Organización Internacional de la Viña y el Vino) ha publicado en 2019 que la producción anual de vino en los últimos años supera los 27.000 millones de litros, situándose España como el 3^{er} productor global en 2018 (4.440 millones de litros) únicamente por detrás de Francia (4.860) e Italia (5.480). Nuestro país se establece como el principal exportador de vino, llegando a enviar fuera de España 2.110 millones de litros en 2018 (un 19,5% del total). Sin embargo, es el 3^o en cuanto a facturación procedente de exportaciones se refiere (2.900 millones de € frente a los 9.300 y 6.100 de Francia e Italia respectivamente) (OIV, 2019).



Figura I. Mapa de la producción global de vino (OIV, 2018)

Por otra parte, detectar y sobre todo remediar defectos en el vino una vez que éste ha sido embotellado es prácticamente imposible y conlleva grandes pérdidas económicas y daños de imagen para las bodegas. Es más, el 48% de los vinos identificados como defectuosos en varios concursos enológicos tienen defectos relacionados con un envejecimiento inadecuado (Ugliano *et al.*, 2009), concretamente con aromas relacionados con la oxidación y la reducción. Lo que implica que habría que intentar evitar estos problemas antes, es decir, durante la elaboración del vino.

1.3 Aroma en la calidad sensorial del vino

La calidad sensorial de un vino se evalúa de forma visual, olfativa, gustativa y por sensaciones táctiles en boca (OIV, 2015). La importancia del aroma durante el consumo de alimentos puede percibirse por vía ortonasal (vía nasal directa) o retronasal, que se da cuando los aromas que han sido liberados en la boca, viajan a través de la faringe para percibirse en la cavidad nasal (Negoiias *et al.*, 2008). En particular la componente retronasal del aroma también es de suma importancia en la percepción del sabor; convirtiéndose el aroma en la principal base de información que maneja el cerebro durante el consumo de alimentos (Shepherd, 2006), teniendo una gran relevancia en la respuesta emocional del consumidor (Ristic *et al.*, 2019).

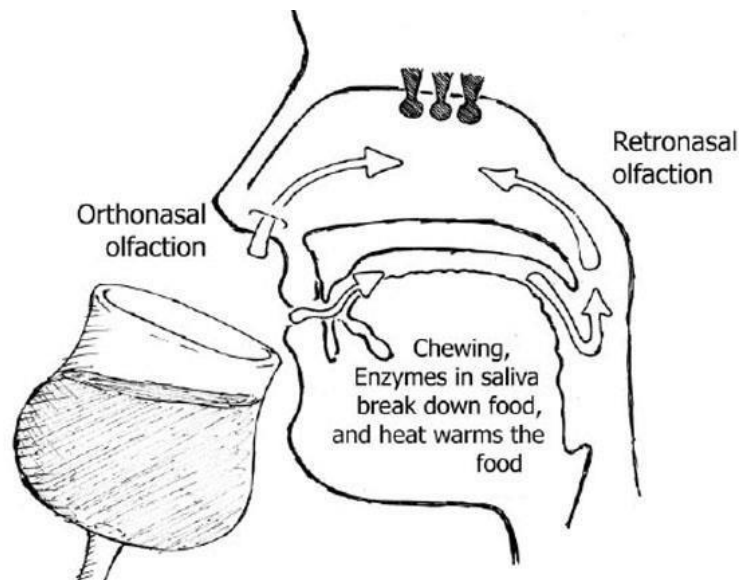


Figura II. Percepciones directa y retronasal del aroma (Liu, 2013)

1.3.1 La importancia del aroma de los aldehídos en el vino

La degradación oxidativa del vino, y sobre todo la formación de aldehídos, influye en gran parte en la vida útil de la mayoría de los vinos. De manera general, se observa una rápida pérdida de las cualidades aromáticas, como los aromas florales y frutales, mientras que aparecen aromas nuevos, típicos de los aldehídos en el vino (Bueno *et al.*, 2010) como los que se describen a continuación:

El isobutanal presenta un olor a malta o tostado (Moore, Forrester & Pelosi, 1976), notas aromáticas que comparte con el 2-metilbutanal y el isovaleraldehído, los cuales eran responsables del olor característico de las primeras cervezas sin alcohol (Beal & Mottram, 1994); el metional, que es el responsable del olor a verdura cocida (Escudero *et al.*, 2000); y el fenilacetaldehído, que se describe con notas de miel y fruta pasa (Silva Ferreira, Hogg & Guedes de Pinho, 2003).

A lo largo de estos años se ha demostrado que la gran relevancia de los dos últimos en el aroma del vino, metional y fenilacetaldehído, se debe a sus bajos umbrales de olfacción: 0,5 µg/L (Escudero *et al.*, 2000) y de 1 µg/L (Culleré, Cacho & Ferreira, 2007), respectivamente. Estos umbrales y las concentraciones a las que se encuentran en los vinos, les proporcionan valores de OAV (Valor de la Actividad Aromática, relación entre la concentración en la que se encuentra un compuesto aromático y su umbral de olfacción) mayores al resto de los aldehídos del vino: hasta de 58 y 130 para metional y fenilacetaldehído respectivamente, frente a máximos de 22, 7 y 11 para isobutanal, 2-metilbutanal e isovaleraldehído respectivamente (Culleré, Cacho & Ferreira, 2007).

1.4 Rutas de formación de los aldehídos de Strecker en el vino

Los aldehídos de Strecker deben su nombre al químico alemán Adolph Strecker quien observó la formación de un aldehído (acetaldehído e isovaleraldehído en diferentes experimentos) mediante la degradación de un α -aminoácido (alanina y leucina respectivamente) utilizando Aloxana (un derivado de la pirimidina con múltiples grupos ceto) (Strecker, 1862).

Casi un siglo después, Schonberg y Moubacher publicaron una lista de diferentes reactivos tanto inorgánicos como compuestos 1,2-dicarbonílicos orgánicos capaces de llevar a cabo la *Degradación de Strecker* en la formación de otros aldehídos como isobutanal, 2-metilbutanal, o fenilacetaldehído desde sus respectivos aminoácidos: valina, isoleucina y fenilalanina (Schonberg & Moubacher, 1952).

Posteriormente, de entre estos compuestos candidatos, se demostró que las *o*-quinonas producidas por la oxidación de ciertos polifenoles, reaccionaban con los aminoácidos para producir sus respectivos aldehídos durante la fermentación del té (Saijō & Takeo, 1970).

Además de los aldehídos ya mencionados anteriormente, se observó la formación de formaldehído, isovaleraldehído y metional a partir de glicina, leucina y metionina respectivamente. En la última década, esta vía de formación ha sido demostrada en medios sintéticos con composiciones similares al vino (Grant-Preece *et al.*, 2013) e incluso utilizando otro tipo de compuestos α -dicarbonílicos como diacetilo o glioxal (Pripis-Nicolau *et al.*, 2000). La producción de aldehídos de Strecker a partir de esta vía química no es la única ruta de formación de éstos y de hecho, su importancia relativa resulta incierta ya que en las condiciones del vino (\approx 12% etanol, 5 g/L de ácido tartárico y pH 3,50), las velocidades de reacción entre aminoácidos y *o*-quinonas son bajas (Nikolantonaki & Waterhouse, 2012).

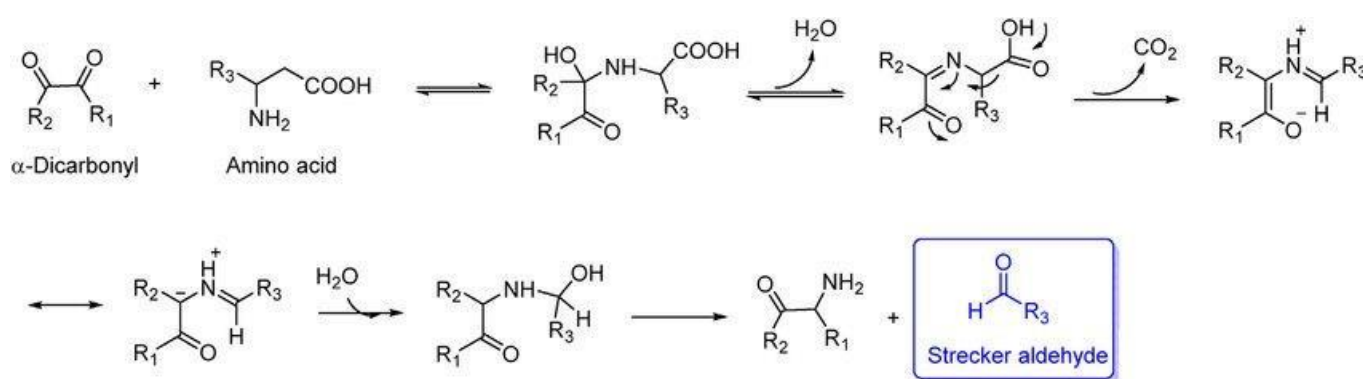


Figura III. Mecanismo de degradación de Strecker (Ho, Zheng, Li. 2015)

Una segunda posibilidad sería la formación directa del aldehído a partir de su alcohol precursor a través de un mecanismo de peroxidación, al igual que se demostró para el acetaldehído (Wildenradt & Singleton, 1974). En esta reacción (Figura IV), se observa cómo durante la oxidación del vino el radical hidroxilo formado podría oxidar otros alcoholes superiores presentes en el medio, como diversos investigadores sugirieron para el metional (Escudero *et al.*, 2000; Ferreira *et al.*, 2014) o el fenilacetaldehído (San Juan *et al.*, 2012).

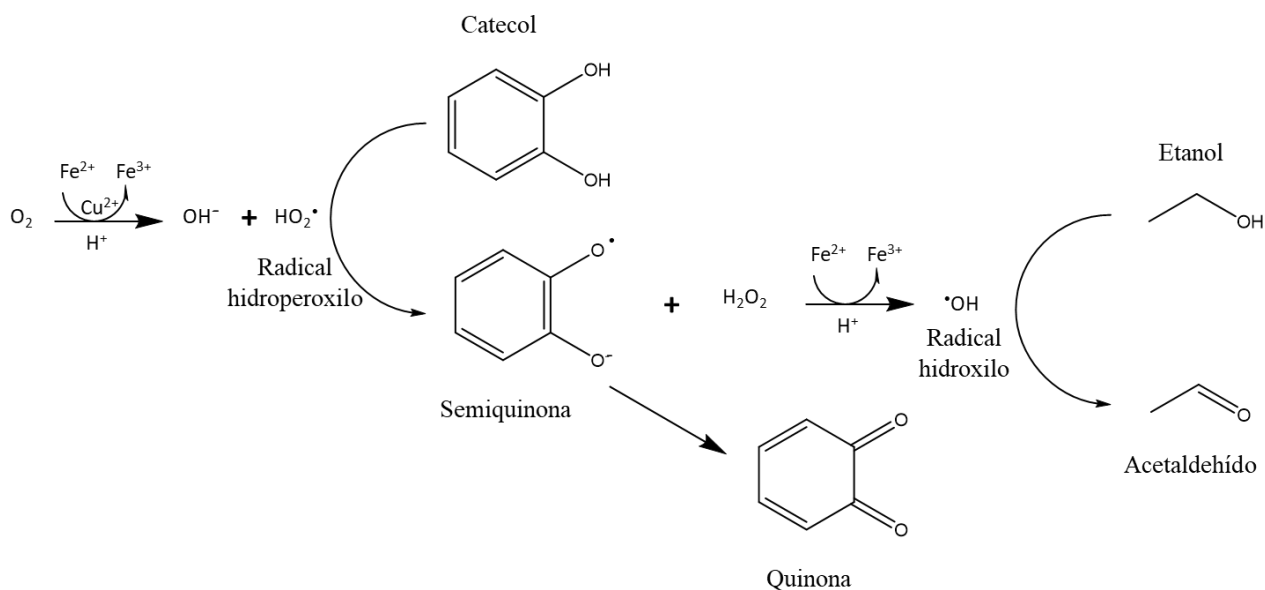


Figura IV. Oxidación de etanol a acetaldehído en el vino (Bueno, 2015)

Sin embargo, la vía de formación de aldehídos más plausible es la Ruta de Ehrlich, que tiene lugar durante la fermentación del mosto. Félix Ehrlich en 1907 comprobó la formación de alcoholes superiores mediante el catabolismo de aminoácidos (Ehrlich, 1907). Este fue el punto de partida para que en estudios posteriores se fijaran los alcoholes superiores junto a sus ácidos como los compuestos aromáticos más importantes de la Ruta de Ehrlich, en la que también se forman aldehídos como intermedios después de la desaminación del aminoácido y la descarboxilación del α -cetoácido pertinente (Styger, Prior & Bauer, 2011). Estos aldehídos intermedios deberían reducirse u oxidarse al correspondiente alcohol o ácido por acción de las enzimas alcohol y aldehído-deshidrogenasas de la levadura (Dickinson, Salgado & Hewlins, 2003).

Otra posible ruta de formación de aldehídos es la conocida como vía biosintética o vía anabólica de la Ruta de Ehrlich. Esta ruta tiene una mayor importancia en situaciones con bajos contenidos de nitrógeno total (Äyräpää, 1968), mientras que, cuando el nitrógeno disponible es suficiente, los aminoácidos son determinantes e inhiben la ruta anabólica (Schulthess & Ettlinger, 1978). La ruta anabólica comienza por la degradación de la glucosa vía piruvato, en la que se generan los mismos α -cetoácidos que los formados tras la desaminación de los aminoácidos (Webb & Ingraham, 1963), siendo estos α -cetoácidos los compuestos donde convergen ambas rutas. En la Figura V se muestra un esquema simplificado de la convergencia de la degradación de la glucosa vía piruvato con la ruta catabólica de Ehrlich:

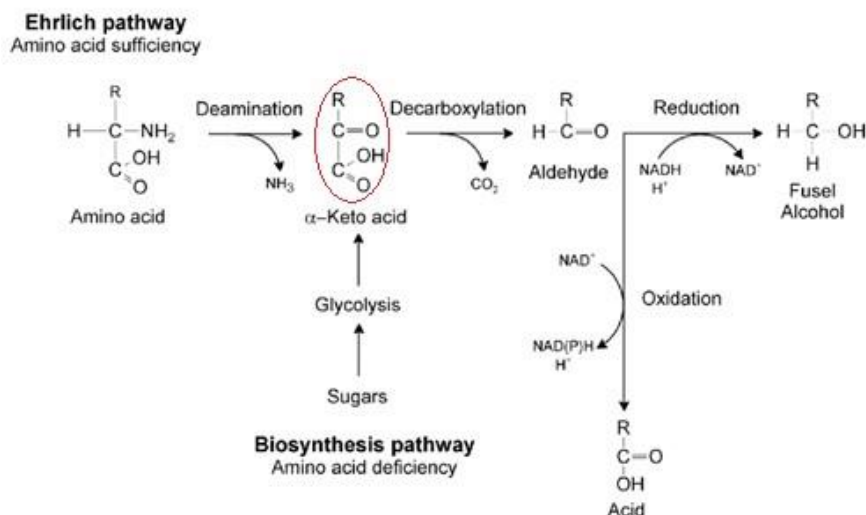


Figura V. Esquema simplificado de la convergencia de las rutas catabólica y anabólica (Klosowski *et al.*, 2015)

Esta vía anabólica tiene una contribución variable para los diferentes alcoholes (Chen, 1978). Se ha demostrado que un aumento de glucosa tiene un efecto directo en el incremento de alcoholes superiores (Klosowski *et al.*, 2015) llegándose a formar alrededor de un 30% de éstos por esta ruta (Reazin, Scales & Andreassen, 1970), lo que afectará también de manera directa a la formación de los aldehídos, que recordemos son intermedios en la producción de alcoholes superiores.

En resumen, los aldehídos se pueden formar por la degradación de Strecker (reacción de aminoácidos con compuestos α -dicarbonílicos), por la oxidación directa de los alcoholes en condiciones de oxidación o durante la fermentación como intermedios en la formación de alcoholes tras la descarboxilación de un α -cetoácido, que puede tener origen en la vía catabólica (degradación de aminoácido) o anabólica (degradación de glucosa vía piruvato). Los alcoholes superiores y ácidos derivados de cada aminoácido se muestran en la Tabla I junto a sus aldehídos intermedios y descripciones aromáticas pertinentes:

Tabla I. Descriptores de las especies aromáticas formadas en la degradación de aminoácidos

Aminoácido	Aldehído intermedio	Descriptores	Alcohol superior	Descriptores	Ácido derivado	Descriptores
Valina	Isobutanal	Malta/Tostado ^a	Isobutanol	Frutal/Alcohol ^e	Ácido isobutírico	Dulce ^e /Queso/Ácido ^f
Isoleucina	2-Metilbutanal	Malta/Tostado ^b	2-Metilbutanol	Almendra/Mazapán ^e	Ácido 2-metilbutírico	Frutal/Graso ^e /Queso/Ácido ^f
Leucina	Isovaleraldehído	Malta/Tostado ^b	Alcohol isoamílico	Alcohólico ^e /Pungente ^f	Ácido isovalérico	Rancio ^e /Queso/Ácido ^f
Fenilalanina	2-Fenilacetaldehído	Miel/Pasa ^c	β-Feniletanol	Rosas ^a	Ácido β-fenilacético	Miel ^c
Metionina	Metional	Verdura cocida ^d	Metionol	Verde/Plástico ^a	Ácido 3-(metiltio)propanoico	Mantequilla/Rancio ^g

a) Moore, Forrester & Pelosi, 1976; b) Beal & Mottram, 1994; c) Silva Ferreira, Hogg & Guedes de Pinho, 2003; d) Escudero *et al.*, 2000;

e) Styger, Prior & Bauer, 2011; f) Culleré, López & Ferreira, 2019; g) Moreira & Guedes de Pinho, 2011.

1.5 Relación del SO₂ con los aldehídos en el vino

Debido a la polarización del grupo carbonilo, los aldehídos son compuestos altamente reactivos. En el vino, son capaces de combinarse con SO₂ (de Azevedo *et al.*, 2007) y polifenoles (Vivar-Quintana *et al.*, 1999) (Nonier Bourden *et al.*, 2008).

El SO₂ es el agente químico más importante utilizado para prevenir la oxidación descontrolada del vino y no sólo sirve como antioxidante, sino que también posee actividad antimicrobiana y antioxidásica (Guerrero & Cantos-Villar, 2015; Carrascón *et al.*, 2018).

La unión del SO₂ libre a los aldehídos forma α -hidroxialquilsulfonatos, que se establecen como uniones fuertes pero reversibles (de Azevedo *et al.*, 2007). Estos aductos son especies inodoras y pueden estar presentes en vinos no oxidados, incluso antes de ser embotellados. Debido a la reversibilidad del equilibrio, a medida que se oxida el SO₂ a lo largo del envejecimiento del vino, se deshacen estas uniones liberándose los aldehídos y por tanto, percibiéndose notas desagradables para el consumidor (Bueno, Carrascón & Ferreira, 2016).

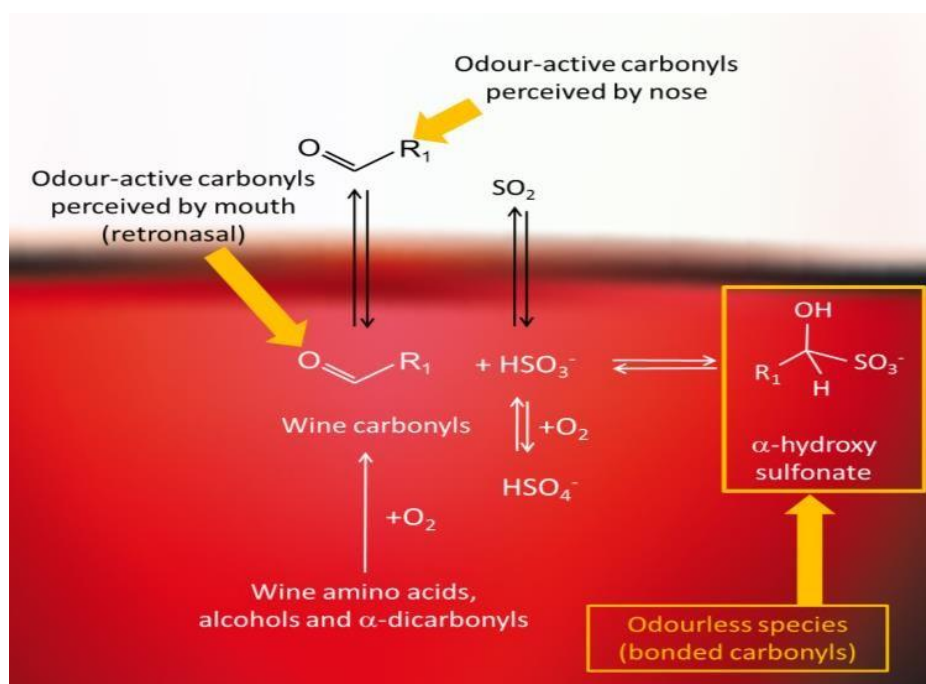


Figura VI. Formación de α -hidroxialquilsulfonato a partir de ion hidrógenosulfito y un compuesto carbonílico (Bueno, 2015)

1.6 Objetivos e importancia del estudio

Desde sus orígenes, el vino siempre ha estado presente en diferentes épocas de la historia y es seguro que lo va a seguir estando por su alto consumo a nivel nacional e internacional (OIV, 2019). Este hecho, unido a los beneficios que puede tener a nivel emocional, en la salud física y en las economías de muchos países, hace que el estudio de mejora de su calidad y producción resulte de vital interés para la sociedad.

Siendo el aroma un parámetro clave en la calidad sensorial del vino, resulta fundamental conocer sus mecanismos de formación, en concreto de los aldehídos, ya que son unos de los compuestos aromáticos más importantes de éste (Culleré, Cacho & Ferreira, 2007).

Por ello, el presente estudio se plantea como principales objetivos:

- Comprender los mecanismos de formación de los aldehídos de Strecker durante la fermentación alcohólica.
- Estudiar el efecto de la levadura y el SO₂ en la formación de aldehídos de Strecker mediante su análisis y el análisis de otros parámetros como los alcoholes producidos en la fermentación, el SO₂ libre y el SO₂ total, el avance de la fermentación o la cantidad de azúcares reductores o acidez volátil.

Por otra parte, los objetivos académicos del trabajo son:

- Desarrollo de la formación del estudiante en el método científico.
- Empleo de recursos de búsqueda bibliográfica.
- Especialización y aplicación de técnicas cromatográficas.
- Uso del análisis estadístico en el tratamiento de datos.
- Reflejo de las conclusiones y aprendizaje a través de la escritura de la memoria y la defensa del trabajo.

Materiales y métodos

2.1 Materiales y reactivos

Los materiales usados son:

- Agitador horizontal Heidolph Promax 1020 (Heidolph Instruments GmbH & Co., Alemania)
- Autoclave AES-28 (Raypa S.L., España)
- Balanza analítica HR-200 (A&D Weighing Co., EEUU)
- Balanza de granatario W Electronic Scale WT30001K (Want Balance Instrument Co., China)
- Cámara de anoxia GP(Concept) (Jacomex SAS, Francia)
- Cámara de flujo laminar PV-100 (Telstar S.A., Japón)
- Cartuchos de 3 mL de polipropileno (Varian Inc., EEUU)
- Centrífuga Centro 8-BL (J.P Selecta S.A., España)
- Equipo de Ultrasonidos Ultrasons 20 (J.P Selecta S.A., España)
- Estufa Memmert 10-800 (Mettler GmbH & Co., Alemania)
- Filtros de membrana de nitrato de celulosa estériles de poros de 0,45 µm NC45ST Membrane Filters White (A&S Filter Co., China)
- Frascos de vidrio de borosilicato PyrexTM de 1L, 500 mL y 250 mL (Fisher Scientific Inc., EEUU)
- Frits de polietileno para cartuchos de 3 mL (Supelco Inc., EEUU)
- Manta calefactora Fibroman-C 500 mL (J.P Selecta S.A., España)
- Matraces aforados de 5 mL (Fisher Scientific Inc., EEUU)
- Matraz de corazón y esférico, regulador de vacío y columna de refrigeración (Sumalsa S.A., España)
- Microjeringas de 50, 100 y 250 µL (Hamilton Co., EEUU)
- Montaje de García-Tena (Laboaragón S.L., España)
- Parafilm M (Bemis Co., EEUU)
- Pipeta 11 mL y probetas de 5,1 y 3,2 mL (Laboaragón S.L., España)
- Pipetas de 5 y 10 mL (Globe Scientific Inc., EEUU)
- Pipetas Pasteur de vidrio (Labbox Labware S.L., España) y de plástico (Deltalab S.L., España)
- Reservorios de 75 mL (Varian Inc., EEUU)
- Sistema de vacío (vacuum manifold) (Agilent Technologies Inc., EEUU)
- Tubos de centrífuga de fondo cónico de 10 mL con tapones de rosca
- Válvulas Muller

- Vasos de precipitado de 25 mL (Labbox Labware S.L., España)
- Viales de 2 mL, viales de 20 mL para espacio de cabeza con cuello roscado y tapón roscado de septum (Thermo Fisher Scientific Inc., EEUU)
- Viales inserto (ALWSCI Technologies Co., China)
- Zapatilla de pesada (Scharlab S.L., España)

Los reactivos usados son:

Mosto sintético

Oligoelementos:

$\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, $\text{Co}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, $\text{NaMoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, CuCl_2 , KIO_3 , H_3BO_3 , ZnCl_2 , $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, KH_2PO_4 y $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (PanReac AppliChem ITW Reagents Co., EEUU).

Vitaminas:

Piridoxina ClH , ácido nicotínico, pantotenato de calcio, tiamina ClH , ácido *p*-aminobenzoico, riboflavina, ácido fólico y biotina (Merck Millipore Corp., Alemania).

Aminoácidos:

Ácido γ -aminobutírico, alanina, tirosina, valina, isoleucina, leucina, asparagina, ácido glutámico, glutamina, serina, glicina, histidina, treonina, arginina, prolina, metionina, fenilalanina y lisina (Merck Millipore Corp., Alemania).

Azúcares:

Glucosa y fructosa (Panreac AppliChem ITW Reagents Co., EEUU).

Ácidos:

Ácido málico y ácido tartárico (PanReac AppliChem ITW Reagents Co., EEUU). Ácido cítrico (Merck Millipore Corp., Alemania).

Varios:

$\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$, $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$, myo-inositol, ergosterol y tween80® 0.05 % (v/v) (Sigma-Aldrich Co., EEUU).

Levaduras:

Fermicru (Oenobrand SAS, Francia), *Merit* (Chr.Hansen A/S, Dinamarca) y *QA23* (Lallemand Inc., Canadá).

Rankine:

NaOH 0,01M, indicador 4,4 combinado (rojo de metilo-azul de metileno), ácido orto-fosfórico al 85% y peróxido de hidrógeno al 3% p/v (10 vol.) (PanReac AppliChem ITW Reagents Co., EEUU).

Azúcares reductores

$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, H_2SO_4 96%, lentejas de NaOH, KI, $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, tartrato de sodio y potasio y almidón soluble (PanReac AppliChem ITW Reagents Co., EEUU).

Acidez volátil

Lentejas de NaOH y fenolftaleína (PanReac AppliChem ITW Reagents Co., EEUU).

Alcoholes superiores

$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (PanReac AppliChem ITW Reagents Co., EEUU), isobutanol, 2-metilbutanol, alcohol isoamílico, metionol y 4-metil-2-pentanol (Sigma-Aldrich Co., EEUU) y β -feniletanol (Honeywell Fluka Inc., EEUU).

Aldehídos totales

PFBHA (*o*-(2,3,4,5,6-pentafluorobencil)hidroxilamina)(Sigma-Aldrich Co., EEUU), agua Milli-Q[®] provista con un sistema Millipore Q-Pod Millipore y resina LiChrolut[®] EN (40-120 μm) (Merck Millipore Corp., Alemania), NaHCO_3 (PanReac AppliChem ITW Reagents Co., EEUU), $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$ absoluto calidad LiChrosolv HPLC, CH_3OH (99,8%) y CH_2Cl_2 (99,8%) calidad Distol Pesticide Residue Grade y n-hexano calidad Organic Trace Analysis (Fisher Scientific Inc, EEUU). Isobutanal ($\geq 99\%$), 2-metilbutanal ($\geq 95\%$), isovaleraldehído ($\geq 95\%$), metional ($\geq 98\%$), fenilacetaldehído ($\geq 95\%$), 2-metilpentanal ($\geq 98\%$), 3-metilpentanal ($\geq 97\%$), (Sigma-Aldrich Co., EEUU), metional d3 ($\geq 90\%$) y fenilacetaldehído d5 ($\geq 95\%$) (Eptes Sàrl, Suiza).

2.2 Elaboración del mosto sintético y diseño de la fermentación

2.2.1 Mosto sintético

En primer lugar, se prepara el mosto sintético siguiendo un procedimiento adaptado de la literatura (Hernandez-Orte *et al*, 2006), obteniéndose un mosto con la siguiente composición (Tabla II) y pH ajustado a 3,5 con NaOH 0,1 M:

Tabla II. Composición del mosto sintético

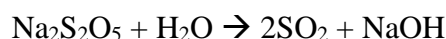
<i>Oligoelementos</i>	Conc. mosto(mg/L)	Aminoácidos	Conc. mosto(mg/L)	(NH ₄) ₂ HPO ₄	Conc. mosto(g/L)
MnCl ₂ · 4H ₂ O	4,7	Ác. γ-aminobutírico	44,4	(NH ₄) ₂ HPO ₄	0,22
Co(NO ₃) ₂ · 6H ₂ O	0,5	Alanina	58,5	<i>Azúcares</i>	Conc. mosto(g/L)
NaMoO ₄ · 2H ₂ O	0,2	Tirosina	14,3	Glucosa	105
CuCl ₂	0,5	Valina	17,7	Fructosa	105
KIO ₃	1,3	Isoleucina	14,4	<i>Ácidos</i>	Conc. mosto(g/L)
H ₃ BO ₃	1	Leucina	13,4	Ác. Málico	0,3
ZnCl ₂	2	Asparagina	34,8	Tartrato	3
<i>Vitaminas</i>	Conc. mosto(mg/L)	Ác. Glutámico	61,8	Ác. Cítrico	0,3
Piridoxina ClH	1	Glutamina	104,8	<i>Oligoelementos II</i>	Conc. mosto(g/L)
Ácido Nicotínico	1	Serina	21,2	MgSO ₄ · 7H ₂ O	0,2
Pantotenato de calcio	1	Glicina	1,1	KH ₂ PO ₄	2
Tiamina ClH	1	Histidina	109,2	CaCl ₂ · 2H ₂ O	0,16
Ác. p-aminobenzoico	1	Treonina	18,8	<i>Otros</i>	Conc. mosto(g/L)
Riboflavina	0,2	Arginina	199,5	Myo Inositol	0,3
Ác. Fólico	0,2	Prolina	241,5	Ergosterol	0,015
Biotina	0,04	Metionina	29,9	Tween 80	0,05(%vol)
		Fenilalanina	11,2		
		Lisina	3,3		

Fermentación: Cepas y SO₂

Se prepararon 3 litros de mosto sintético, manipulados en el interior de una cámara de flujo laminar PV-100 (Telstar S.A., Japón), la cual permite trabajar en condiciones de esterilidad. Todo el material utilizado fue esterilizado previamente en un autoclave AES-28 (Raypa S.L., España). En primer lugar, se realizó un filtrado a vacío a través de filtros de nitrato de celulosa con 0,45 µm de tamaño de poro (A&S Filter Co., China), de tal manera que se repartió 1 litro en 3 frascos PyrexTM de este volumen.

La finalidad de la separación en tres alícuotas se debe a que cada uno de los mostos se incubó con una cepa diferente de *Saccharomyces Cerevisiae*: *QA23* (Lallemand Inc., Canadá), *Merit* (Chr. Hansen, Dinamarca) y *Fermicru* (Oenobrand, Francia). Antes de ser incubadas en el mosto, las levaduras fueron activadas siguiendo el procedimiento indicado por el fabricante: se tomaron 300 mg de levadura y se activaron durante 20 minutos a 35°C en agua destilada en frascos PyrexTM de 50 mL; se terminó la activación con la adición de 10 mL de mosto sintético y su reposo durante 10 minutos a la misma temperatura.

Posteriormente, el mosto inoculado con cada cepa se volvió a dividir a su vez en dos, para poder dopar uno de ellos con 3 mL de $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$ 8710 mg/L. De este modo, de cada cepa inoculada se obtuvieron 500 mL de mosto sintético estéril control y de mosto dopado con aproximadamente 50 mg/L de $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$. Siguiendo la estequiometría de la ecuación ajustada y si el rendimiento de la reacción de descomposición del $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$ es del 100%, se espera un aumento de 35 mg/L de SO_2 en los mostos dopados.



Finalmente, el contenido de cada bote Pyrex™ se dividió en tres. Se depositaron 150 mL del mosto con o sin $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$ de cada cepa en Pyrex™ de 250 mL, se cerraron con válvulas Muller que limitan la entrada de O_2 durante la fermentación, se registró el peso inicial de cada fermentador y se almacenaron a 20°C hasta el final del proceso fermentativo. El diseño experimental de la fermentación viene reflejado en el siguiente diagrama:

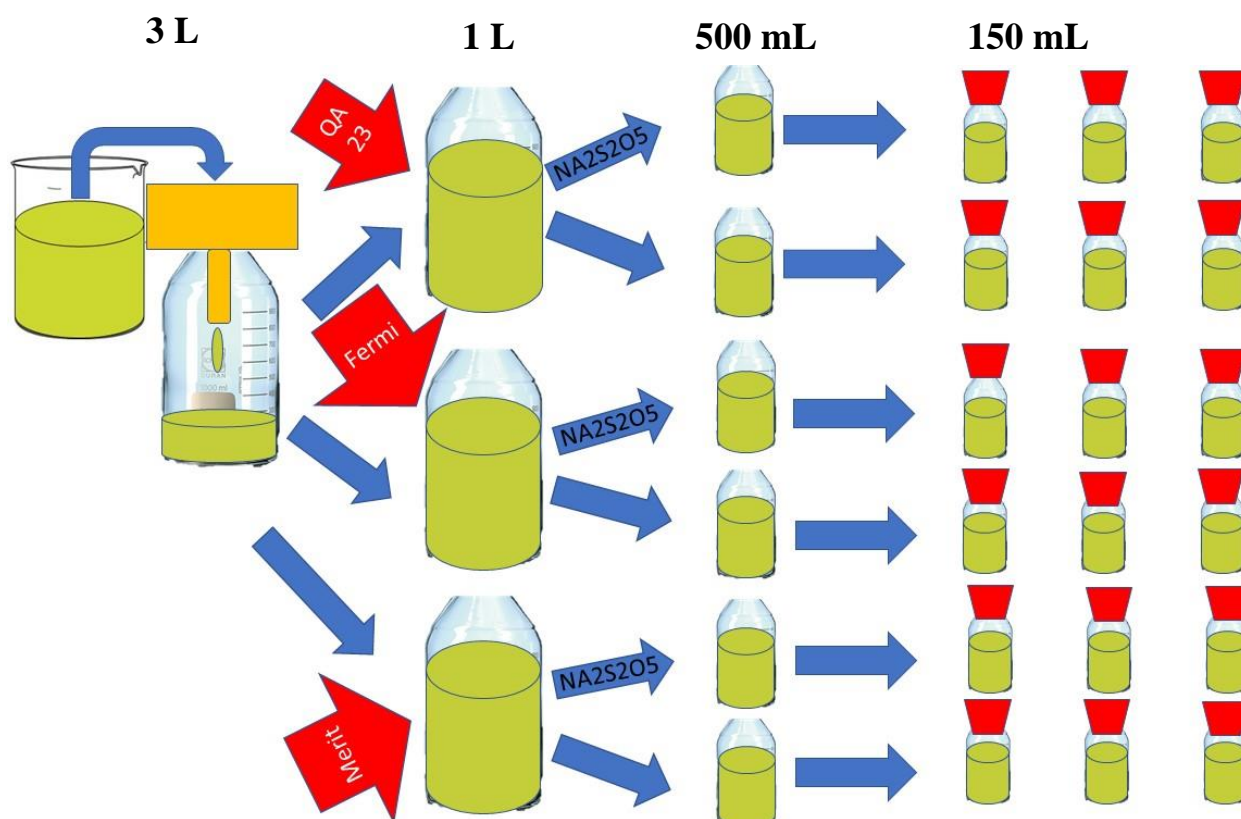


Figura VII. Diagrama de distribución del mosto de fermentación

2.2.2 Registro de datos durante la fermentación

A lo largo de la fermentación, se registró la pérdida de peso de cada fermentador cada 24 horas para así conocer la cinética de la curva de fermentación y su final. La fermentación se dio por terminada cuando la pérdida de peso por día fue inferior a 0,1 g.

Una vez finalizadas las fermentaciones, los fermentadores fueron sonicados durante 10 minutos para eliminar el máximo de CO_2 posible antes de su introducción en una cámara de anoxia GP(Concept) (Jacomex SAS, Francia). El uso de la cámara de anoxia es necesario para conservar y evitar la indeseada oxidación del vino hasta su análisis. El vino se dejó reposar al menos 24 horas para que precipitaran las lías o levaduras muertas, antes de tomar las muestras para realizar los diferentes análisis. De este modo, se minimiza su exposición al aire, ya que todos los análisis no pueden realizarse a la vez.

2.3 Determinación de azúcares reductores: Estabilidad microbiológica de los vinos

Los métodos de su determinación se basan en la oxidación de los azúcares por Cu^{2+} en medio alcalino para que en caliente se produzca su reducción a Cu^+ por acción de los azúcares de la muestra. En nuestro caso, se trata de una valoración indirecta ya que el exceso de Cu^{2+} no reducido por los azúcares oxida I^- a IO_3^- , que en medio ácido se convierte en I_2 y finalmente se valora frente a $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$, con almidón como indicador. El viraje de la valoración es de color pardo a crema.

La diferencia entre el volumen empleado en la valoración de muestras testigo y el empleado en cada muestra refleja el contenido de azúcares reductores en g/L en el vino. El método de análisis empleado viene descrito en el libro *Productos derivados de la uva y similares: métodos oficiales de análisis* (Panreac, 1983).

2.4 Determinación de la acidez volátil: Método García-Tena

La determinación de la acidez volátil se llevó a cabo siguiendo el método García-Tena (García Barceló, 1976), consistente en la separación de ácidos volátiles con arrastre de vapor de agua y rectificación de los vapores. Los primeros 5,1 mL de destilado se desechan y los 3,2 mL siguientes se valoran en una volumetría ácido-base frente a NaOH 0,02M utilizando fenolftaleína como indicador, cuyo viraje es de incoloro a rosa.

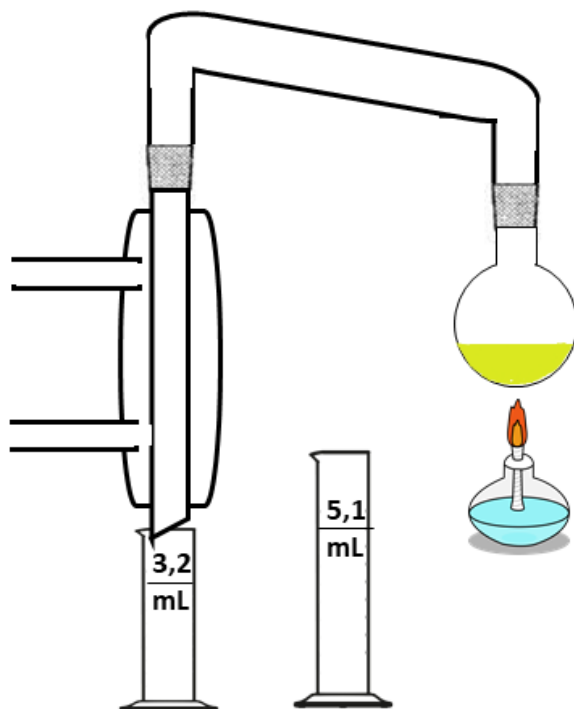


Figura VIII. Esquema del montaje de la destilación en García-Tena

La acidez volátil se calcula mediante la siguiente fórmula:

$$V_{NaOH(mL)} \times 0,366 = g/L \text{ de ácido acético}$$

2.5 Determinación de SO₂ libre, combinado y total: Método Rankine

Se entiende como anhídrido sulfuroso libre al que se encuentra como SO₂, H₂SO₃, HSO₃⁻ y SO₃⁻² mientras que el combinado viene dado por la diferencia entre el total y el libre (OIV, 2009). De forma que el método descrito por Rankine (Rankine & Pocock, 1970) y recomendado por la OIV (OIV, 2009) se basa en la aspiración con corriente de aire del SO₂ libre presente en la muestra acidificada, su oxidación por borboteo con una solución de H₂O₂ en el matraz corazón y posterior valoración con NaOH 0,01M del H₂SO₄ formado en este matraz. El indicador es una mezcla de rojo de metilo-azul de metileno y su viraje es de morado a verde.

En el caso de que la determinación se realice a temperatura ambiente se mide el SO₂ libre. A continuación, se repone el matraz corazón y se repite la determinación sobre la misma muestra con la ayuda de una manta calefactora, alcanzando una temperatura aproximada de 100 °C, lo que permite obtener el SO₂ combinado. El tiempo de arrastre del SO₂ es de 15 minutos en ambos casos. El montaje viene esquematizado en la figura IX:

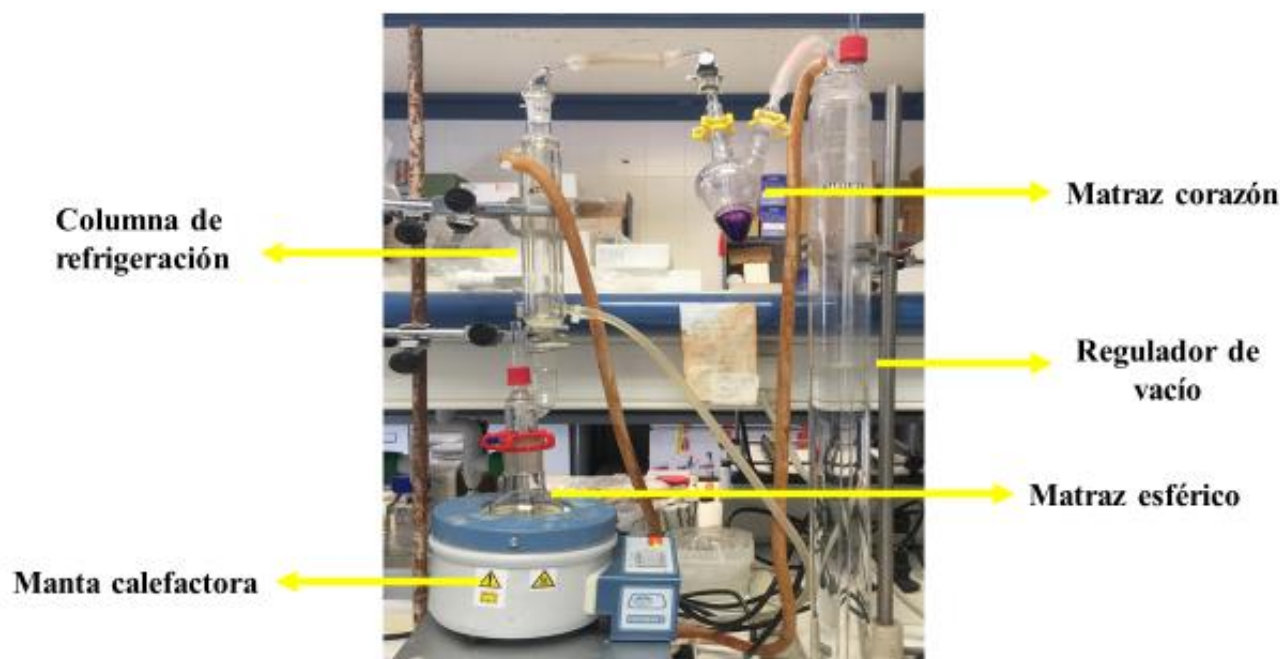


Figura IX. Montaje de método Rankine para análisis de SO₂ total (con manta calefactora).

El contenido de SO₂ (libre o combinado, dependiendo del ensayo) se obtiene con la siguiente fórmula:

$$V_{NaOH} (mL) \times 32 = mg/L SO_2$$

El SO₂ total viene dado por la suma de SO₂ libre y combinado.

2.6 Determinación de alcoholes derivados o superiores

2.6.1 Extracción de los alcoholes de la muestra

El análisis de los alcoholes derivados (o superiores) se realizó partiendo de un procedimiento optimizado por el LAEE (Laboratorio de Análisis del Aroma y Enología), basado en una microextracción líquido-líquido del vino previamente diluido con salmuera con una pequeña cantidad de CH₂Cl₂ (Ortega *et al.*, 2001). Brevemente, se mezclan 4,1g de sulfato amónico con 2,7 mL de vino que contienen 1.33 mg/L de 4-metil-2-pentanol (estándar interno), 6,3 mL de agua milliQ y se le adicionan 250 µL de CH₂Cl₂. Se agita la mezcla (agitadora horizontal Heidolph Promax 1020, Heidolph Instruments GmbH & Co., Alemania) a 90 r.p.m durante 90 minutos y se centrifuga (Centro 8-BL, J.P. Selecta S.A., España) durante 10 minutos a 2500 r.p.m para separar la fase orgánica.

2.6.2 Análisis por GC-MS (Cromatografía de gases acoplada a Espectrometría de Masas)

El análisis instrumental de los extractos se llevó a cabo en GC-MS empleando el instrumento GC-450 (Varian Inc., EEUU) acoplado a un IT (Trampa de Iones) Varian Saturn 2200 como sistema detector. Se inyectó 1 μL de cada extracto en la relación de Split optimizada de 1/100 (sección 3.5.1) con el inyector a 250 °C y con pulso de presión de 30 psi durante 2,18 minutos. El gas portador utilizado fue He, con una velocidad lineal constante de 25 cm/s y un flujo de columna de 1,5 mL/min. La columna cromatográfica usada fue una DB-WAX UI (60 m \times 0,25 mm \times 0,25 μm) (Agilent Technologies Inc., EEUU) siendo estos parámetros la longitud (m), diámetro interno (mm) y espesor de fase (μm), además la columna está precedida por una pre-columna de silica desactivada de 3m \times 0,32 mm del mismo fabricante. La línea de transferencia se mantuvo a 220 °C y el detector a 170 °C. El programa de temperatura del horno cromatográfico también fue optimizado (sección 3.5.1).

2.6.3 Cuantificación de los alcoholes superiores

La cuantificación se llevó a cabo a través de las áreas relativas de los picos cromatográficos respecto al estándar interno y mediante el empleo de factores de respuesta. El factor de respuesta se calculó mediante extractos de CH_2Cl_2 obtenidos a partir de vinos sintéticos que contienen cantidades conocidas de los analitos (20 mg/L para el isobutanol, 50 mg/L para el 2-metilbutanol, 150 mg/L para el isoamílico, 30 mg/L para β -feniletanol y 2 mg/L de metionol), asemejándose éstas a las concentraciones promedio del vino (San Juan *et al.*, 2012; Ferreira *et al.*, 2014; Bueno, Carrascón & Ferreira, 2018).

Los iones seleccionados para la identificación y cuantificación de los analitos se muestran en la Tabla III junto a sus tiempos de retención:

Tabla III. Iones seleccionados en GC-MS de alcoholes superiores

T.ret (min)	Compuesto	<i>m/z</i>
16,21	Isobutanol	41, 43
21,10	4-metil-2-pentanol	45, 69, 43
23,59	2-metilbutanol	56
23,68	3-metilbutanol	55, 42, 71
36,04	Metionol	106
37,51	β -feniletanol	91, 92

2.7 Determinación de aldehídos totales

2.7.1 Equilibrado de los estándares internos con la matriz y derivatización

Al abrigo del oxígeno, se tomaron 12 mL de cada fermentador (almacenados en anoxia) y se llevaron a viales de tapón roscado con septum (Thermo Fisher Scientific Inc., EEUU), a los cuales se les añadió 50 μ L de disolución de estándares internos (disolución conjunta en etanol de 20 mg/L de 2-metilpentanal, 3-metilpentanal, metional deuterado y fenilacetaldehído deuterado preparada a partir de las disoluciones individuales de 3000 mg/L), quedando una concentración de 83 μ g/L en cada muestra.

A continuación, los viales se sacaron de la cámara de anoxia y se llevaron a un horno a 50 °C durante 5 horas, para que se establezcan los equilibrios entre los estándares internos aldehídicos añadidos y los compuestos presentes en la matriz.

Posteriormente se añadieron 360 μ L de disolución de derivatizantes (10 g/L de PFBHA en agua) a través del septum, evitando así la exposición de la muestra al aire. La reacción de derivatización se completa tras 12 horas a 35 °C.

2.7.2 Extracción de las oximas por SPE (Extracción en Fase Sólida)

A continuación, se realizó la SPE en cartuchos de 30 mg de resina polimérica LiChrolut® EN (Merck Millipore Corp., Alemania). Cada cartucho se acondicionó con CH_2Cl_2 , CH_3OH y disolución hidroalcohólica $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}/\text{H}_2\text{O}$ 12% (v/v), antes de pasar 10 mL de cada muestra por la resina. Después, se pasó una disolución de lavado al 1% de NaHCO_3 en 60% (v/v) de CH_3OH en H_2O , para eliminar excesos de oximas de carbonilos mayoritarios, como las de los ácidos. Tras el secado de los cartuchos a vacío, las oximas retenidas se eluyeron con 1,2 mL de hexano. Finalmente, los restos acuosos se secaron con Na_2SO_4 antes del análisis cromatográfico. El proceso completo de derivatización y extracción viene esquematizado en el siguiente diagrama:

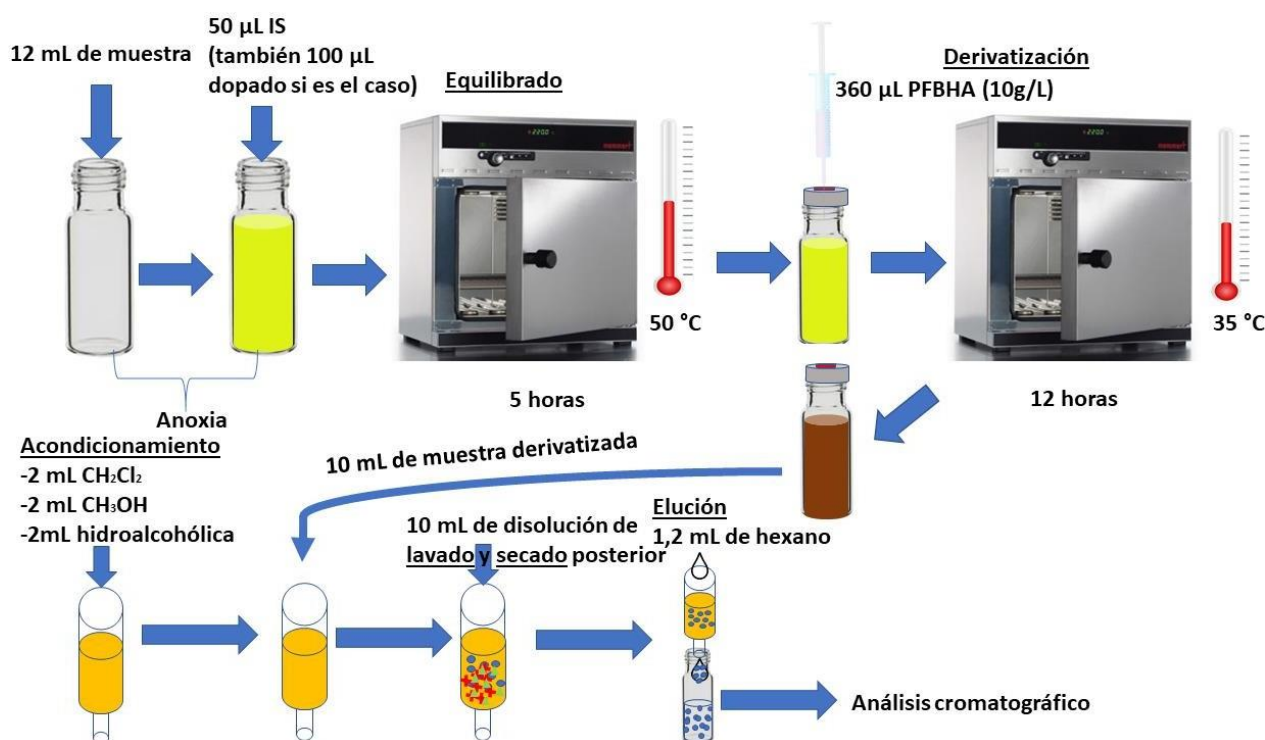


Figura X. Diagrama de flujo de la derivatización y extracción de los aldehídos totales

2.7.3 Análisis de las oximas por GC-MS

Se inyectaron 3 µL de cada extracto en el cromatógrafo Shimadzu GCMS-QP2010 (Shimadzu Corp., Japón) con un cuadrupolo como analizador. Las inyecciones se realizaron en splitless con el inyector a 250 °C y con pulsos de presión de 300 KPa durante 1,5 minutos. Se usó He como gas portador, con una velocidad lineal constante de 40,5 cm/s, resultando en un flujo de 1,26 mL/min y una purga de 1,0 mL/min. La columna cromatográfica usada fue una DB-WAXETR (30 m × 0,25 mm × 0,5 µm) (J&W Scientific, EEUU), siendo estos parámetros la longitud (m), diámetro interno (mm) y espesor de fase (µm). La columna iba precedida de una pre-columna (Supelco Incorporation, EEUU) de 3 m × 0,25 mm. El programa de temperaturas utilizado en el horno cromatográfico se muestra en la siguiente tabla:

Tabla IV. Programa de temperaturas utilizado en GC-MS de aldehídos totales

Temperatura (°C)	Rampa de temperatura (°C /min)	Tiempo mantenido a la temperatura indicada (minutos)
40	-	4
250	10	10

La fuente de ionización utilizada fue EI (Impacto Electrónico) a 220 °C, mientras que la línea de transferencia se mantuvo a 230 °C. Otro de los parámetros a considerar es el analizador de masas, que operó en modo SIM (Monitorización del Ión Seleccionado). Los iones seleccionados para la identificación y/o cuantificación de los analitos y los estándares se muestran en la siguiente tabla junto a sus ventanas de adquisición.

Tabla V. Ventanas de adquisición e iones seleccionados en GC-MS de aldehídos totales

Ventana(min)	T.ret (min)	Compuesto	m/z cuantificación	m/z identificación
14,70-15,30	14,87	Isobutanal	250	195, 239
	15,93	2-metilbutanal	239	195, 253
	16,25	3-metilbutanal (pico 1)	239	195, 266
15,60-18,00	16,49	3-metilbutanal (pico 2)	239	195, 266
	16,82	2-metilpentanal	253	195, 266
	17,52	3-metilpentanal (pico 1)	239	181, 266
	17,73	3-metilpentanal (pico 2)	239	181, 266
22,30-22,90	22,50	Metional deuterado	302	181, 252
	22,53	Metional	299	181, 252
23,55-24,65	24,21	Fenilacetaldehído deuterado	301	96, 181
	24,23	Fenilacetaldehído	297	91, 181

2.7.4 Cuantificación de las oximas

Al igual que para el análisis de alcoholes superiores, la cuantificación tuvo lugar por el método del factor de respuesta. Para ello, se tomaron de cada muestra 3 mL y se unieron formando un combinado, del que se separaron 4 alícuotas en viales de 12 mL. Dos de estas alícuotas permanecen como tal y a las otras dos se les adicionaron 200 µL de disolución de dopado (disolución conjunta de 20 mg/L de isobutanal, 2-metilbutanal, isovaleraldehído, metional y fenilacetaldehído, preparada por pesada a partir de las disoluciones individuales de 3000 mg/L).

2.8 Tratamiento de datos

El tratamiento de los datos obtenidos se realizó en PSPP para Windows, empleado para realizar las pruebas estadísticas de Levene (homocedasticidad de las varianzas), Kruskal-Wallis (comparación de medias con varianzas no homogéneas), ANOVAs (Análisis de Varianza, únicamente válido en caso de homocedasticidad de varianzas) de dos factores con interacción (factores: tipo de levadura y nivel de SO₂ al inicio de la fermentación) y Post hoc (localización de las diferencias significativas), en concreto la LSD (Mínima Diferencia Significativa).

Se utilizó Microsoft Excel 2019 para el graficado de datos y el análisis de las concentraciones de las señales cromatográficas mediante el cálculo de las áreas relativas y los factores de respuesta.

También fueron empleados los softwares MS Data Review (Varian Inc., EEUU) y GCMS Post-Run Analysis (Shimadzu Corp., Japón) para la identificación e integración de los picos cromatográficos correspondientes a los análisis de alcoholes superiores y aldehídos respectivamente.

Resultados y discusión

3.1 Evolución de las fermentaciones

La incubación de las levaduras se realizó partiendo de levaduras secas activas, ya que permiten que el proceso sea reproducible y controlable (Miranda-Castilleja *et al.*, 2015). Durante la fermentación alcohólica, la conversión de $C_6H_{12}O_6$ en CH_3CH_2OH y CO_2 , conlleva una disminución de peso por la pérdida de CO_2 (Bely, Sablayrolles & Barre, 1990). El control de esta pérdida permite conocer el estado de la fermentación, cuyas variaciones de peso (y con ello las propias fermentaciones) finalizaron tras 27 días en los casos más tardíos. Con el registro diario realizado de las pérdidas es posible obtener gráficas como la Figura XII o la Figura XIII:

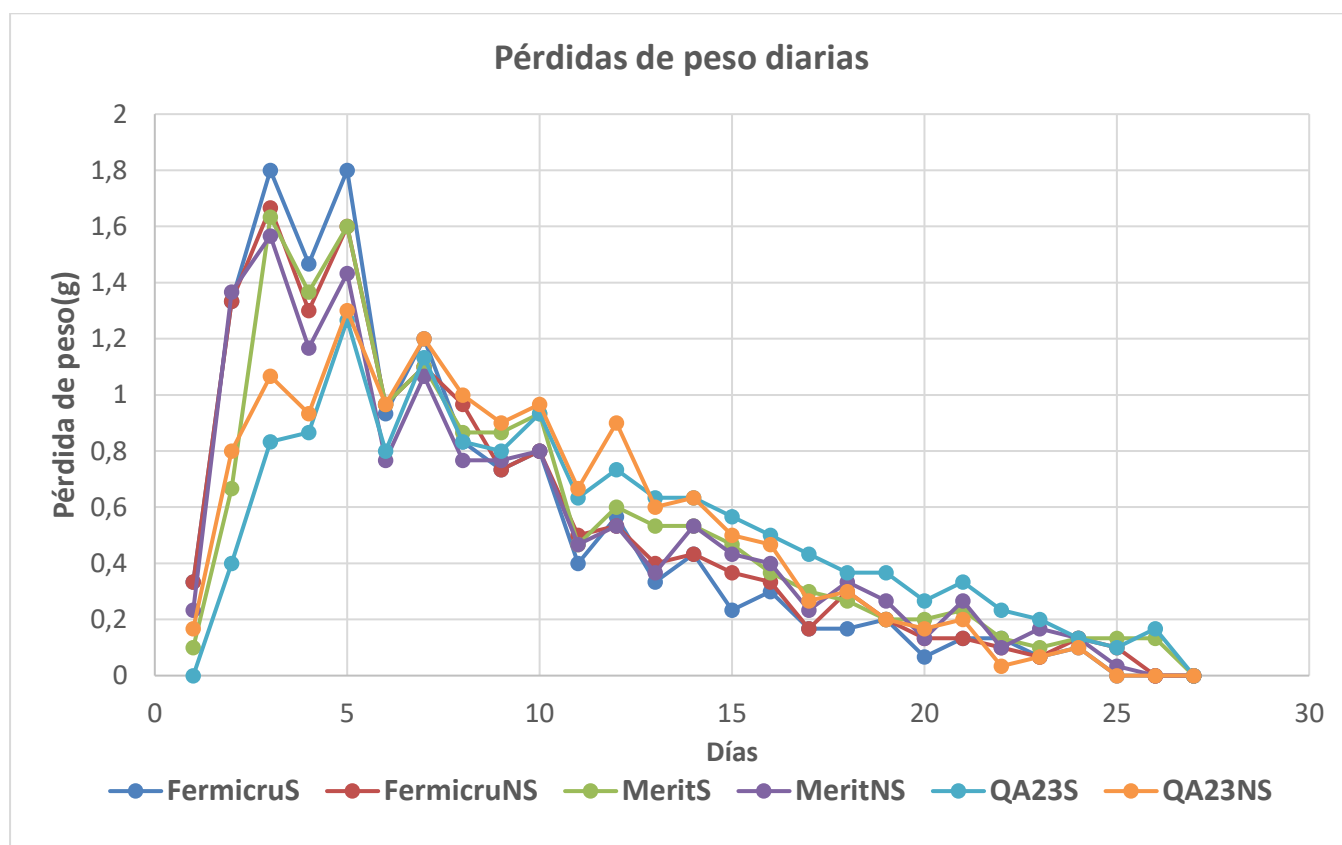


Figura XII. Pérdidas diarias de peso para las diferentes cepas y condiciones S (35 mg/L SO_2 ; NS: sin dopar).

Evaluando los resultados mostrados en la Figura XII con un ANOVA de dos factores, resultó que las velocidades máximas (dadas por el valor de las pendientes máximas) de pérdida de peso fueron estadísticamente iguales respecto a la cantidad de SO_2 inicial; mientras que existían diferencias significativas según la naturaleza de la cepa. Según la LSD, *Fermicru* y *Merit* mostraron velocidades máximas equivalentes, y *QA23* mostró velocidades significativamente menores ($p < 0,05$). Este hecho llevó a comprobar si la eficiencia de la fermentación alcohólica fue similar o no en función de las condiciones, determinación que se realizó mediante la pérdida total de peso a lo largo de la fermentación, como se refleja en la Figura XIII:

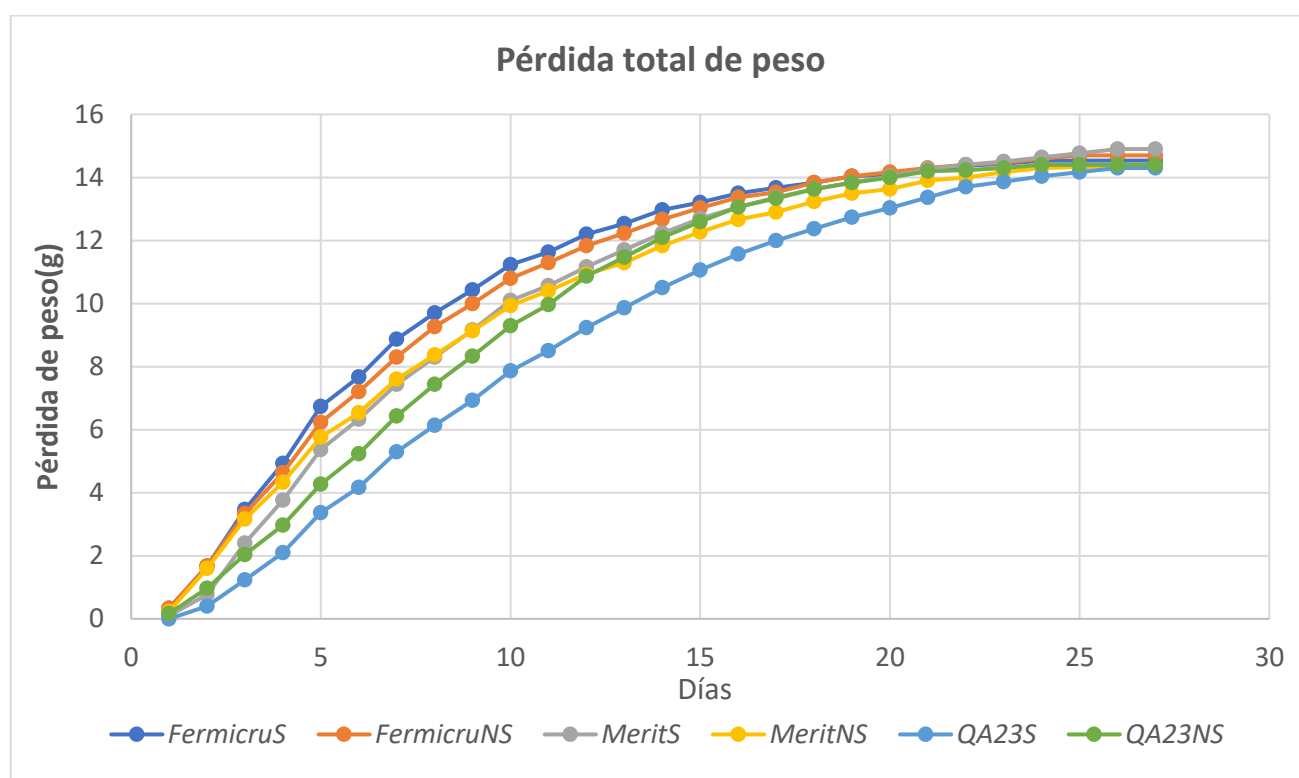


Figura XIII. Pérdida total de peso de las diferentes cepas y concentraciones de SO_2 (S: 35 mg/L SO_2 ; NS: sin dopar)

Para las pérdidas de peso totales pasados 27 días, las varianzas no fueron homogéneas ($p_{\text{Levene}} < 0,05$) y por lo tanto se realizó una prueba de Kruskal-Wallis. Se obtuvo que las pérdidas de peso eran estadísticamente iguales entre los experimentos ($p > 0,05$), siendo pérdidas reproducibles con DSR (Desviación Estándar Relativa) inferiores al 6%.

Estos resultados muestran que se alcanza el mismo nivel de producción de CO₂ (avance de la fermentación alcohólica) en todas las condiciones, aunque el tiempo necesario para completar cada fermentación sea variable. En la Figura XIII, se muestra cómo las cepas *Merit* y *QA23* dopadas fueron las últimas en acabar, ya que su peso fue el que más tardó en estabilizarse. Este hecho es coherente con otros estudios que señalan la sensibilidad de algunas levaduras a la cantidad de SO₂ en el medio, lo que se refleja en una disminución de su actividad fermentativa y, por tanto, en unos tiempos de fermentación más largos para algunas cepas, tales como la propia *QA23* (Morgan *et al.*, 2019).

Además, el ANOVA de dos factores con las pérdidas de peso totales de cada muestra durante los primeros 5 días, muestra la existencia de diferencias significativas ($p < 0,05$) debidas de nuevo a la cepa (la pérdida de peso para *QA23* es menor) y con una tendencia en la influencia de la interacción cepa-SO₂ dopado ($p < 0,1$). Esta interacción implica que a cada cepa le influye de manera diferente la cantidad de SO₂ inicial. Tras analizar la LSD, se observa cómo existe únicamente en la cepa *QA23* una disimilitud entre la velocidad máxima con y sin SO₂, siendo la dopada inferior a la no dopada.

Esta diferencia, evidencia todavía más la sensibilidad de esta cepa al SO₂, que se ve reflejada en la cinética al inicio de la fermentación (Figura XII). La existencia de diferencias en los primeros 3-5 días, podría deberse a que en este primer estadio, hay una mayor cantidad de SO₂ libre presente en el mosto (Sun, 2016), causando una mayor lentitud en su actividad en aquellas cepas susceptibles al SO₂, durante esta fase de la fermentación.

3.2 Azúcares reductores

Uno de los aspectos que convierten a *Saccharomyces* en el género por excelencia para la fermentación alcohólica es la gran eficiencia que muestra en la conversión de azúcares (Ranieri & Pretorius, 2000).

El interés en la medición de los azúcares reductores en el vino, se debe a que un nivel bajo de éstos marca la finalización de la fermentación alcohólica, ya que se habrán transformado la mayoría de los azúcares iniciales en alcohol. Si la cantidad de azúcares reductores es inferior a 4 g/L, se considera un vino seco (OIV, 2011), lo que garantiza la estabilidad microbiológica de éste (Zoecklein *et al.*, 1999; Jackson, 2020). En cuanto a las cepas estudiadas en este trabajo, se han obtenido los resultados que se muestran a continuación:

Tabla VI. Rangos de los contenidos en azúcares reductores de los vinos obtenidos con diferentes cepas *Saccharomyces Cerevisiae* (S: 35 mg/L SO₂; NS: sin dopar)

Muestra	Azúcares reductores (g/L)
<i>Fermicru</i>NS	0,05 - 0,62
<i>Fermicru</i>S	0,32 - 0,61
<i>Merit</i>NS	0,22 - 0,51
<i>Merit</i>S	0 - 0,93
<i>QA23</i>NS	0 - 1,04
<i>QA23</i>S	0 - 1,43

Partiendo de estos resultados, se puede asegurar que la fermentación había finalizado por completo y además se puede determinar que todos los vinos obtenidos son vinos secos, estables microbiológicamente. Este hecho implica, que en el tiempo transcurrido hasta realizar los análisis no hubo cambios asociados en los vinos por causas microbiológicas.

Estudiando la actividad metabólica de las diferentes cepas y en las distintas condiciones en relación a los azúcares, se realizó un test Kruskal-Wallis debido ya que las varianzas no eran homogéneas ($p_{\text{Levene}} < 0,05$). Las muestras resultaron estadísticamente similares ($p > 0,05$), infiriéndose que ni la naturaleza de las cepas ni el contenido de SO₂ inicial del mosto influyó en la cantidad de azúcares reductores residuales al finalizar la fermentación.

Estos resultados son coherentes con lo encontrado en el apartado anterior, respecto a la pérdida total de peso. Además, coinciden con fermentaciones realizadas en mostos reales utilizando dos cepas diferentes de *Saccharomyces cerevisiae*, donde un igual contenido de azúcares residuales se encontró al finalizar la fermentación alcohólica en muestras con 50 mg/L de SO₂ de diferencia (Morgan *et al.*, 2019).

3.3 Acidez volátil

El análisis de la acidez volátil es de suma importancia en el vino, pues salvo excepciones, su límite legal es de 1,2 g/L (20 mEq/L) para vinos tintos y de 1,1g/L (18 mEq/L) para blancos y rosados (OIV,2020) (Reglamento (UE) n° 934/2019). Aunque a partir de concentraciones alrededor de 0,8 g/L, el vino empieza a ser notablemente ácido y adquiere un olor desagradable propio del vinagre (Bely, Rinaldi & Dubourdieu, 2003). Los resultados de los análisis de la acidez volátil de las diferentes muestras se reflejan en la Figura XIV junto a sus desviaciones estándar. Claramente se observa cómo todos los vinos obtenidos están por debajo de esos niveles de acidez volátil indeseados.

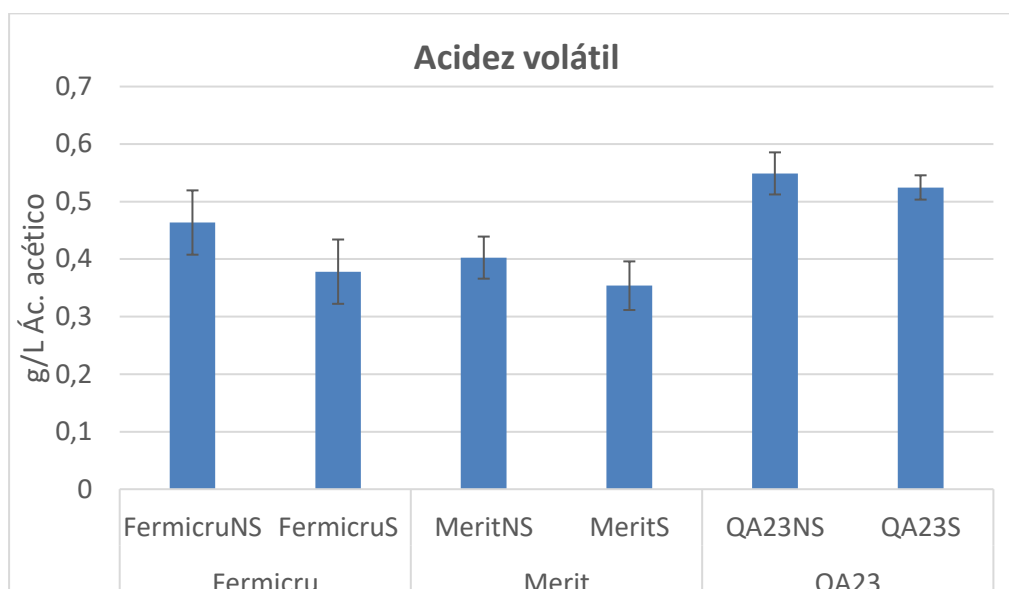


Figura XIV. Niveles de acidez volátil y sus desviaciones estándar (NS: sin dopar; S: 35 mg/L SO₂)

Siguiendo una metodología similar a la del resto de análisis, los datos fueron sometidos a un ANOVA de dos factores, que reflejó la influencia significativa de los factores cepa y SO₂_{dopado} en los niveles de acidez volátil ($p < 0,05$), pero sin llegar a existir una influencia significativa de su interacción en los resultados ($p > 0,05$).

Las diferencias estadísticas encontradas reflejan que las cepas *Merit* y *Fermicru* tienen significativamente menos acidez volátil que *QA23*. En cuanto a las muestras dopadas con SO₂, producen significativamente menor cantidad de ácido acético.

El SO₂ puede ser captado por la levadura tanto en forma molecular como en sus iones HSO₃⁻ y SO₃⁻² (Divol, du Toit & Duckit, 2012) y su contenido en el medio durante el inicio de la fermentación descende, tanto más cuanto mayor sea la adaptación de las cepas al SO₂ (Morgan *et al.*, 2019). Como se ha abordado previamente, *QA23* es la cepa más susceptible al SO₂ en cuanto a actividad metabólica se refiere, lo que la convierte en la menos adaptada a la hora de tomar el SO₂ del medio, incorporarlo y aprovecharlo metabólicamente (Nadai *et al.*, 2016). Justamente, es durante el inicio de la fermentación alcohólica cuando se forma el ácido acético (Coote & Kirsop, 1974) y está descrito que la presencia de SO₂ a niveles superiores a 95 mg/L podría inhibir la capacidad de algunas cepas para reducir la acidez volátil del vino (Vilela-Moura *et al.*, 2010). En este trabajo se está observando justo lo contrario, aunque con cantidades menores de SO₂ (35 mg/L), su presencia está relacionada con la reducción de la acidez volátil y por eso las cepas más sensibles al SO₂, como *QA23*, no logran tener valores tan bajos de acidez como las cepas resistentes.

3.4 SO₂ libre, combinado y total

Un excesivo consumo de SO₂ puede acarrear efectos negativos sobre la salud que puedan contraponerse a los beneficios que otorgan los polifenoles del vino (Chirumbolo & Bjørklund, 2016). Por ello, la OIV fija un límite en su concentración total en función del tipo de vino (blanco, tinto o rosado) y de su contenido en azúcares reductores (mayor/menor a 4 g/L). Para vinos con un contenido en azúcares inferior a 4 g/L, como es nuestro caso, el límite de SO₂ total es de 150 mg/L para vinos tintos y de 200 mg/L para blancos y rosados (OIV, 2020) (Reglamento (UE) n° 934/2019).

Los resultados obtenidos para el análisis del SO₂ libre, combinado y total se muestran en la Figura XV, en la que se observa cómo los valores obtenidos resultaron ser muy inferiores en relación a los límites permitidos:

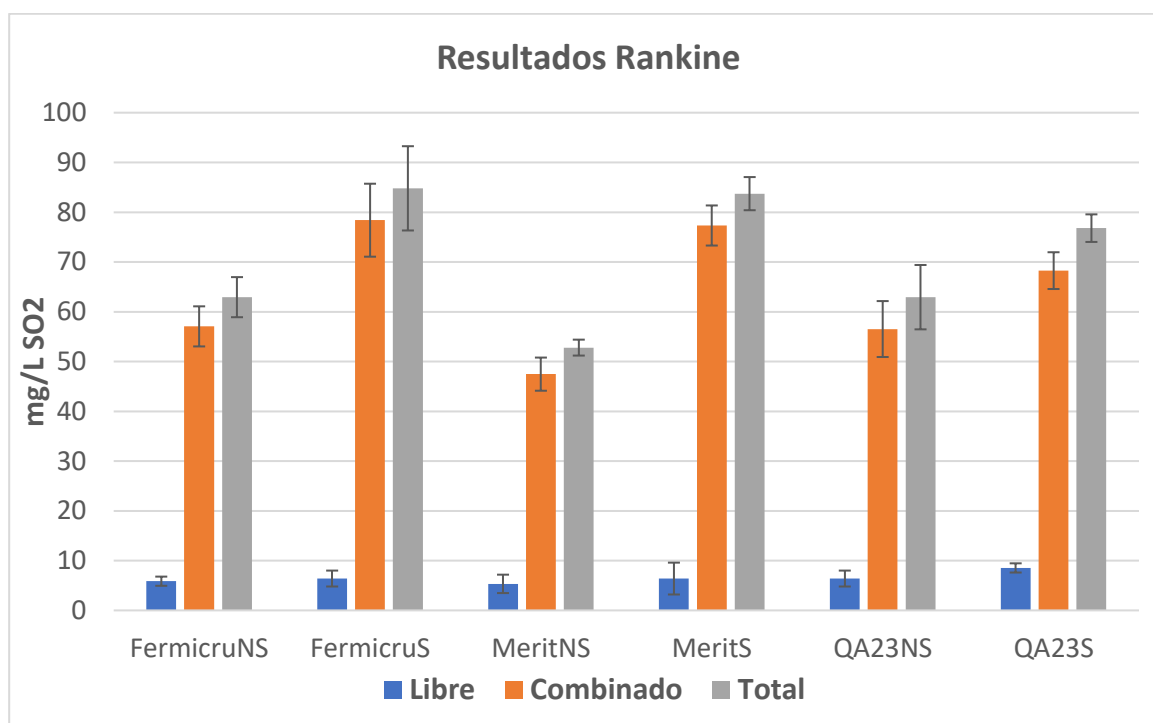


Figura XV. Concentraciones de SO₂ libre, combinado y total por Rankine junto a sus desviaciones estándar (NS: sin dopar; S: 35 mg/L SO₂)

Las concentraciones de SO₂ libre para los diferentes experimentos resultaron ser estadísticamente iguales y siempre con valores inferiores a 10 g/L.

No así es el caso del combinado, en el que el mismo tipo de ANOVA reflejó una fuerte influencia de la presencia de SO₂ inicial ($p < 0,001$) y una interacción significativa entre los factores cepa-SO₂_{dopado} ($p < 0,05$). En este caso las muestras con SO₂ inicial presentaron niveles mayores de SO₂ combinado al final de la fermentación, pero para *Fermicru* y *Merit* esta diferencia es mayor de 20 mg/L mientras que para *QA23* está en torno a 10 mg/L.

Los valores de SO₂ total muestran el mismo patrón que los valores de SO₂ combinado. De nuevo para el SO₂ total existe influencia del factor SO₂ inicial ($p < 0,001$) e interacción significativa cepa-SO₂dopado. La LSD indica que las muestras dopadas presentaron niveles mayores de SO₂ total con medias de 82 g/L frente a los 60 g/L de media para las muestras no dopadas inicialmente. Además, aunque no se mantiene la diferencia inicial de 35 mg/L, vuelve a verse que estas diferencias son mayores para *Fermicru* y *Merit* que para el caso de *QA23*.

Los resultados muestran cómo la cantidad de SO₂ total en todos los casos es superior a la existente al comenzar la fermentación, lo que se explica con el hecho de que durante la fermentación, las levaduras pueden llegar a producir una cantidad significativa de SO₂ que varía en función de su metabolismo, desde unos pocos miligramos hasta más de 100 mg/L (Blondin, 2014).

También destacar que el 90% del SO₂ total de todas las muestras analizadas se encuentra combinado, mayormente con los aldehídos que se han producido, puesto que nuestro vino sintético formado no contiene otros elementos que puedan combinarse con el SO₂. Este hecho está en concordancia con los resultados publicados por Bueno, Carrascón y Ferreira (2016). Por otra parte, Nadai *et al.* (2016) ya observaron que aquellas cepas que muestran una mayor resistencia frente al SO₂ producen niveles más altos de SO₂ total en relación a las más sensibles, lo que coincide con los resultados obtenidos, ya que las muestras dopadas inicialmente con SO₂ de *Fermicru* y *Merit* obtienen valores superiores a las de *QA23*.

3.5 Alcoholes derivados o superiores

3.5.1 Optimización del Split y programa de temperaturas

El programa de análisis de los alcoholes fue optimizado en términos de Split y rampa de temperatura del horno. Para ello se utilizó una disolución de CH₂Cl₂ que contenía cantidades conocidas de analitos y similares a las esperadas en el vino (mencionadas anteriormente en el apartado 2.6.3). Se probaron inyecciones en splitless y relaciones de Split de 1/20 y 1/50 y 1/100. Se descartó la inyección en splitless, por la forma no gaussiana de los picos ya que eran excesivamente grandes. En cuanto a las relaciones de Split, la relación finalmente elegida de 1/100 fue la que presentó una mejor separación para los picos de 2-metilbutanol y alcohol isoamílico.

Por otro lado, el programa de temperaturas fue optimizado con vista a realizar un mayor número de muestras en menos tiempo. De manera que respecto al programa inicial, que duraba más de dos horas, el optimizado para el análisis de estos alcoholes tarda 42 minutos. Esta optimización se logró acelerando el programa con aumentos de temperaturas en aquellas zonas en las que no eluían los analitos de interés y dejando igual o incluso ralentizando las zonas en las que sí. Sin embargo, y a pesar de que el análisis se ha realizado escogiendo relaciones m/z específicas para los analitos, se deberían estudiar posibles interferencias si se analiza una matriz de vino real, lo que podría requerir un reajuste del programa de temperaturas por la presencia de un mayor número de compuestos.

Tabla VII. Programa de temperaturas en GC-MS de alcoholes superiores

Temperatura (°C)	Rampa de temperatura (°C /min)	Tiempo mantenido a la temperatura indicada (minutos)
35	-	3
80	2	0
160	10	0
240	30	5

3.5.2 Cuantificación de alcoholes

La figura XVI se muestra los niveles de cada alcohol resultante tras la fermentación en cada una de las condiciones junto a sus desviaciones estándar. Se observa que los rangos obtenidos para los alcoholes oscilan desde alrededor de 5 mg/L para el metionol a cantidades entre 80 y 100 mg/L para el alcohol isoamílico, con concentraciones medias de 34 mg/L para isobutanol, 28 mg/L para 2-metilbutanol y 16 mg/L para β -feniletanol. Estas cantidades coinciden con resultados encontrados en vino real (San Juan *et al.*, 2012; Ferreira *et al.*, 2014; Bueno, Carrascón & Ferreira, 2018), que expresados en mg/L son:

Isobutanol: 21-76 Isoamílico + 2-metilbutanol: 111-450 Metionol: 0,6-5 β -feniletanol: 19-104

Hay que destacar que en este estudio se logró realizar la cuantificación por separado del 2-metilbutanol y el alcohol isoamílico gracias a la optimización de la rampa de temperatura y al uso de m/z específicas en la adquisición y cuantificación de datos, cuando en los estudios citados los habían cuantificado de forma conjunta usando un FID (Detector de Ionización de Llama).

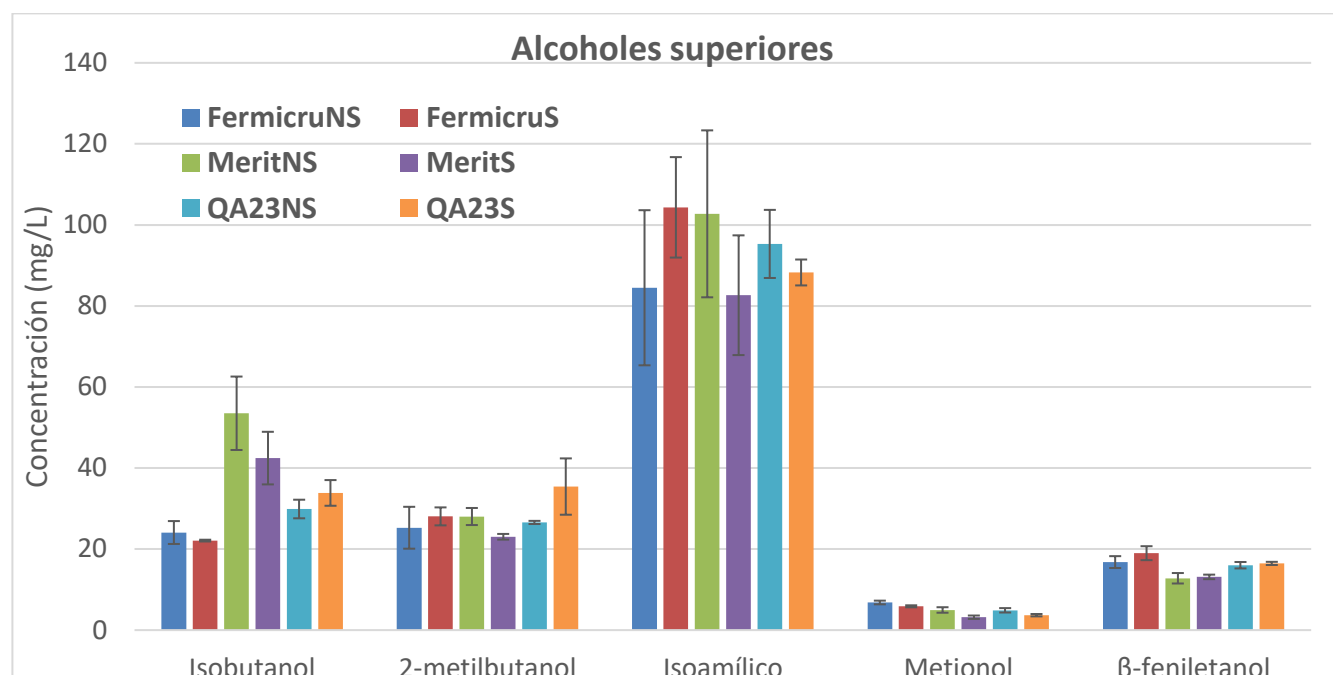


Figura XVI. Niveles de alcoholes superiores para cada condición experimental (NS: sin dopar; S: 35 mg/L SO₂)

A la hora de resumir la influencia de los factores estudiados, la Tabla VIII muestra los resultados obtenidos en los ANOVA de dos factores, tanto para alcoholes como para aldehídos y el ratio aldehído/alcohol que serán comentados más adelante en la memoria. En base a los resultados es posible establecer diferentes comportamientos para las diferentes levaduras en las cantidades variables de SO₂ inicial.

En primer lugar, la mayoría de los alcoholes estudiados se forman en niveles diferentes según el factor cepa ($p < 0,001$), con la excepción del alcohol isoamílico (no significativo) y teniendo en cuenta que sólo es una tendencia para el 2-metilbutanol ($p < 0,1$). En caso del isobutanol, *Merit* mostró mayor capacidad de producir este alcohol, seguida de *QA23* y con *Fermicru* presentando los valores más bajos. En cuanto al 2-metilbutanol, la cepa *QA23* presentó un mayor contenido que *Fermicru* y *Merit*, que resultaron equivalentes. Más opuestos son los resultados de metionol y β-feniletanol. En lo referente a metionol, se aprecia que *Fermicru* tuvo un contenido mayor que *Merit* y *QA23*, mientras que para el β-feniletanol *Fermicru* y *QA23* presentaron valores similares pero mayores que los de *Merit*. Tanto la importancia del efecto cepa como la variación de cuál es la cepa que forma más alcohol eran de esperar, debido a la cantidad de estudios previos que ponen estos hechos de manifiesto, pues vienen asociados a diferentes tendencias metabólicas propias de cada levadura (Giudici, Romano & Zambonelli, 1990; Lurton *et al.*, 1995; Patel & Shibamoto, 2002). Como bien se expresa en los resultados del estudio, las diferentes cepas han presentado concentraciones variables de alcoholes superiores a pesar de haber sido fermentadas con la misma cantidad de diferentes aminoácidos.

Tabla VIII. Factores significativos en las concentraciones de aldehídos, alcoholes y las ratios aldehído/alcohol

Aldehído	Factores influyentes			Alcohol	Factores influyentes			Ratio	Factores influyentes		
	Cepa	SO ₂ dopado	Interacción		Cepa	SO ₂ dopado	Interacción		Cepa	SO ₂ dopado	Interacción
Isobutanal	✓	✗	✗	Isobutanol	✓	✗	✓*	Isobutanal/Isobutanol	✓	✗	✗
2-metilbutanal	✗	✗	✗	2-metilbutanol	✓*	✗	✓	2-metilbutanal/2-metilbutanol	✗	✗	✓
Isovaleraldehído	✗	✓*	✗	Isoamílico	✗	✗	✗	Isovaleraldehído/Isoamílico	✗	✓	✗
Metional	✓	✗	✓	Metionol	✓	✓	✗	Metional/Metionol	✓	✓	✗
Fenilacetaldehído	✗	✓	✗	β-feniletanol	✓	✗	✗	Fenilacetaldehído/β-feniletanol	✗	✓	✗

*Factores con tendencia (ANOVA $p < 0,1$) a influir en las concentraciones

En lo referente al factor $\text{SO}_{2\text{dopado}}$, sólo el caso del metionol resultó significativo ($p < 0,001$). Para las tres cepas estudiadas se encontró un mayor contenido de metionol cuando el medio fermentativo no fue dopado con SO_2 . Esta observación apoyaría la hipótesis mencionada en el apartado 1.5, donde la formación de los α -hidroxialquilsulfonatos impediría la reducción de los aldehídos a sus correspondientes alcoholes. Por lo tanto y según la literatura, como el metional es el aldehído estudiado que presenta mayor constante de equilibrio para la formación de estos aductos (Bueno, Zapata & Ferreira, 2014), tiene lógica que sea el compuesto donde este hecho sea más relevante. A mayor cantidad de SO_2 inicial en el medio, mayor cantidad de aductos metional- SO_2 se forman y por tanto menor será el metionol al finalizar la fermentación.

En cuanto a la interacción entre ambos factores fue significativa para el 2-metilbutanol ($p < 0,05$) y una tendencia para el isobutanol ($p < 0,1$). Sin embargo, en ambos casos los comportamientos reflejados en las cepas según el contenido de SO_2 inicial fueron los mismos: sin diferencias en *Fermicru*, mayor contenido de alcohol cuando el medio fermentativo no fue dopado con SO_2 para *Merit*, y al contrario en *QA23*, donde el contenido del alcohol aumenta cuando añadimos SO_2 al mosto sintético inicial (lo cual es contrario a la hipótesis mencionada en el párrafo anterior)

Para el caso del alcohol isoamílico, no se aprecia la influencia de ninguno de los factores o de su interacción. Puesto que su aldehído correspondiente, el isovaleraldehído, es el segundo de los aldehídos estudiados con mayor tendencia a formar α -hidroxialquilsulfonatos (Bueno, Zapata & Ferreira, 2014), se esperaba que al menos el factor SO_2 o la interacción cepa- SO_2 afectara a las concentraciones del alcohol isoamílico. Pero seguramente, esta igualdad estadística viene causada por las elevadas incertidumbres que presentaron las fermentaciones de una misma condición para la concentración de este alcohol, llegando en algunos casos a alcanzar DSR del 20%.

3.6 Aldehídos totales

3.6.1 Complejidad del análisis y detectabilidad de los aldehídos

El análisis de los aldehídos totales tiene como principio su derivatización, ya que particularmente los de bajo peso molecular como los que queremos estudiar, se caracterizan por ser altamente reactivos, volátiles, polares y lábiles, propiedades que ocasionan su pérdida durante el tratamiento de muestra previo a la inyección cromatográfica (Spiteller, Kern & Spiteller, 1999). Los aldehídos presentan pobres propiedades cromatográficas y malas señales espectrométricas, debidas a la ausencia de estructuras de resonancia, por la tendencia a perder CO neutro y por su pequeño tamaño. Razones que conducen a que los análisis más empleados consten de una etapa de derivatización que los convierta en compuestos de mayor peso molecular y menos polares (Bueno, 2015).

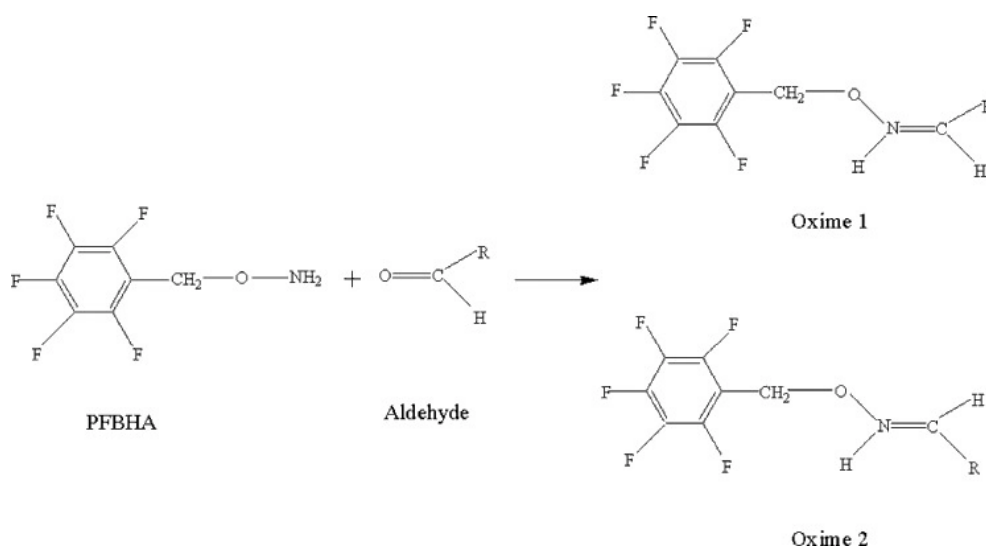


Figura XVII. Formación de oximas por derivatización de aldehído con PFBHA (Deng & Zhang, 2004)

La técnica de análisis empleada en este caso combina una derivatización directa en la propia matriz, que tiene como ventaja una mejor solubilidad y contacto del agente derivatizante con los analitos, junto con la concentración y etapas de limpieza que aporta la SPE (Zapata *et al.*, 2010).

3.6.2 Aldehídos de Strecker totales en la fermentación alcohólica

A continuación, en la Figura XVIII, se muestran los valores obtenidos para cada aldehído para las diferentes variables experimentales junto a sus desviaciones estándar:

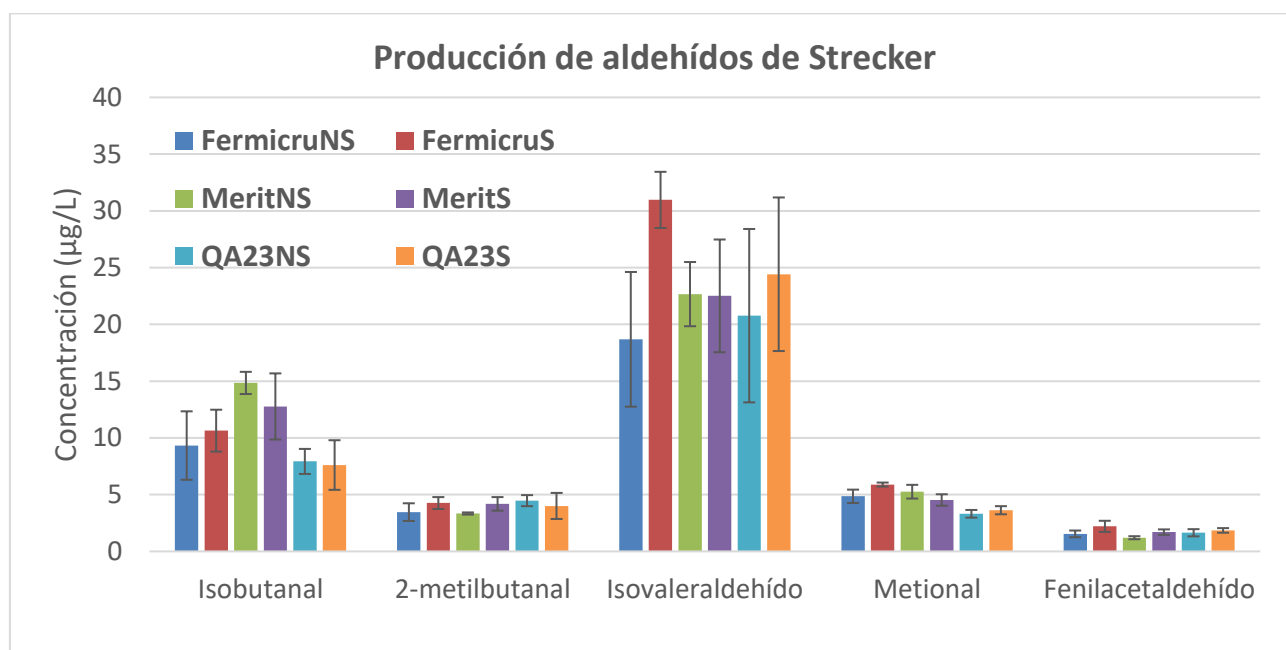


Figura XVIII. Niveles de aldehídos para cada condición experimental (NS: sin dopar; S: 35 mg/L SO₂)

En lo que respecta a la formación de aldehídos, podemos inferir que las concentraciones obtenidas con medias de 11 µg/L para isobutanol, 4 µg/L para 2-metilbutanal, 23 µg/L para isovaleraldehído, 5 µg/L para metional y 2 µg/L para fenilacetaldehído, son acordes a niveles de aldehídos reflejados en varios vinos comerciales que incluyen blancos, tintos y rosados, con la excepción del fenilacetaldehído (Castejón-Musulén *et al.*, en preparación). Esos rangos en vino real en µg/L son:

Isobutanol: 11-51	2-metilbutanal: 3-10
Isovaleraldehído: 8-42	Metional: 1-12
	Fenilacetaldehído: 6-34

Este hecho confirmaría la importancia de la Ruta de Ehrlich en la formación de isobutanol, 2-metilbutanal, isovaleraldehído y metional durante la fermentación alcohólica, produciendo prácticamente la totalidad de estos aldehídos. El hecho de que el fenilacetaldehído se haya formado a niveles muy bajos, implica que la relevancia de la Ruta de Ehrlich varía según cada pareja aldehído/alcohol (Cheng, 1978). Es posible que para este aldehído las otras rutas propuestas como la formación directa por mecanismos de peroxidación o la degradación de Strecker tengan más peso y sean consecuencia de una indeseada oxidación de los vinos durante el proceso de elaboración.

Cabe destacar que la cantidad total encontrada en todas las condiciones experimentales de estos aldehídos supera sus umbrales de olfacción (6 µg/L para isobutanal; 4,6 µg/L para isovaleraldehído, Culleré, Cacho & Ferreira, 2007; 0,5 µg/L para metional, Escudero *et al.*, 2000; y 1 µg/L para fenilacetaldehído, Culleré, Cacho & Ferreira, 2007) con la excepción del 2-metilbutanal (16 µg/L, Culleré, Cacho & Ferreira, 2007). Esto no significa que al acabar la fermentación estos valores proporcionen notas negativas, sino que ya están presentes en proporciones en las cuales un desplazamiento del equilibrio del SO₂ por oxidación directa pueda producir problemas sensoriales.

Los factores significativamente determinantes en la concentración de aldehídos o con tendencia a ello, vienen reflejados para cada analito en la Tabla VIII. En la tabla se muestra la influencia del factor cepa para isobutanal y metional, mientras que el factor SO₂ inicial influye en el fenilacetaldehído y se observa una tendencia para el isovaleraldehído. Por último, únicamente el metional presenta la interacción cepa-SO₂dopado como significativa.

Para el isobutanal, la cepa (único factor influyente) más productora resultó ser *Merit*, mientras que para el metional fueron *Fermicru* y *Merit*. En cuanto al efecto del SO₂ inicial en el medio, tanto para el fenilacetaldehído como para el isovaleraldehído, y para el metional exclusivamente en el caso de *Fermicru*, se observa una mayor concentración de aldehído a mayor cantidad de SO₂ inicial. El caso del metional es el reflejo de cómo el SO₂ puede afectar de manera diferente a las distintas cepas, ya que para las otras dos cepas no se encontraron diferencias significativas entre las muestras con presencia o ausencia inicial de SO₂.

Resulta interesante apreciar cómo en los aldehídos en los que influye el SO₂, bien de forma directa (o tendencia) o interaccionando con las cepas de diferente manera son el metional, fenilacetaldehído e isovaleraldehído, que son los tres aldehídos que mayor constante de formación de α-hidroxiálquilsulfonatos presentan (Bueno, Zapata & Ferreira, 2014). Por ello, con el fin de poder tener una perspectiva más general de la situación, el siguiente apartado aborda la relación aldehído/alcohol que muestra cada condición, ratio que va a determinar realmente la eficiencia de cada cepa en las diferentes condiciones en completar la Ruta de Ehrlich hasta los alcoholes superiores.

3.6.3 Equilibrio aldehído-alcohol en función de las condiciones cepa-SO₂ iniciales

El interés en el estudio de esta relación radica en que por la vía en que se forman los alcoholes superiores, siendo el aldehído un intermedio de ésta, la cantidad de ambos va a estar relacionada con la efectividad y selectividad del sistema enzimático de cada levadura y con especies presentes, como el SO₂, capaces de proteger a los aldehídos de estas reacciones enzimáticas (Perpete & Collin, 2000). Estas ratios han sido calculadas en µg/L de aldehído por mg/L de alcohol superior derivado, que aparecen junto a sus intervalos de confianza en la Figura XIX:

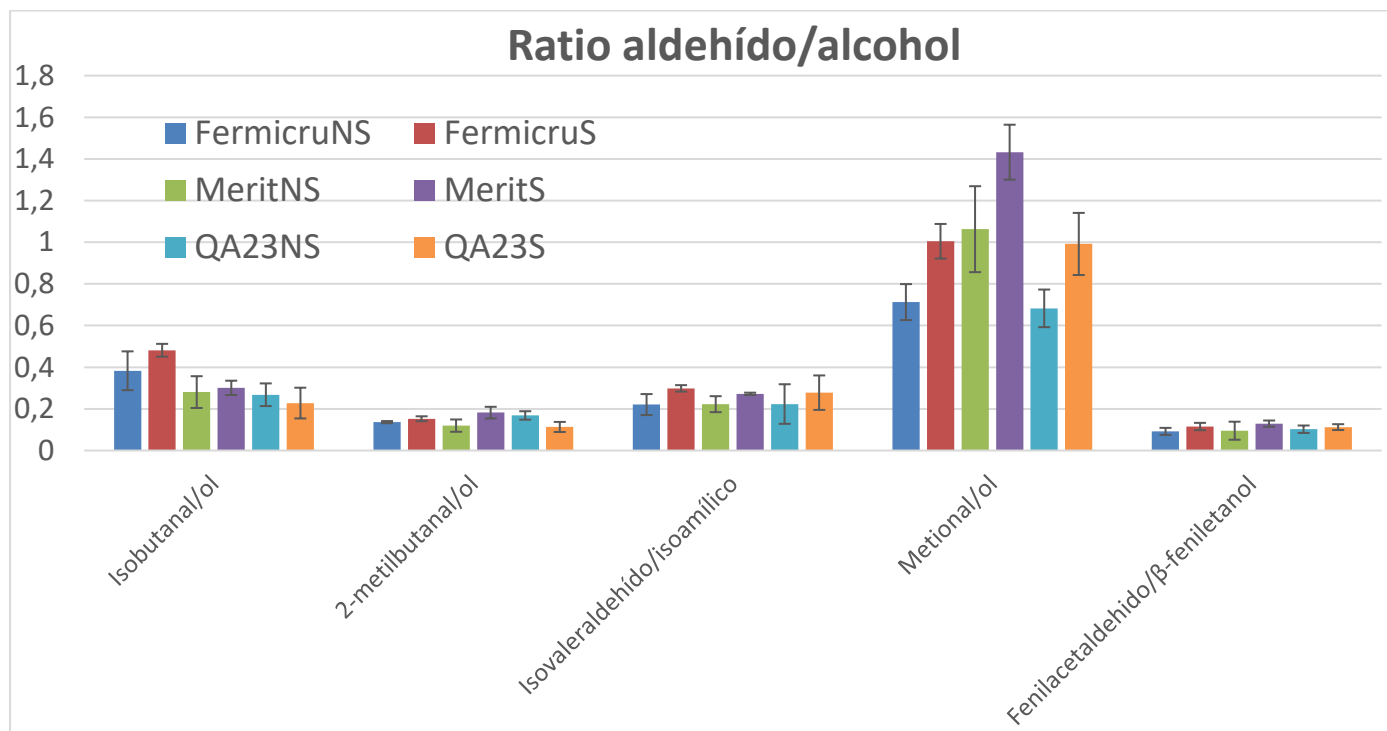


Figura XIX. Ratios aldehído alcohol (NS: sin dopar; S: 35 mg/L;)

En vista de los valores de las ratios obtenidas para cada caso y con ayuda del ANOVA se pueden deducir los factores determinantes para la concentración final de cada aldehído, que se muestran junto al resto de factores determinantes de los aldehídos y alcoholes en la Tabla VIII.

En primer lugar, cabe destacar que en todas las ratios influye al menos un parámetro, ya sea un factor o la interacción entre ellos. El factor SO_2 parece ser el más prevalente ya que es estadísticamente significativo en las ratios isovaleraldehído/isoamílico, metional/metionol y fenilacetaldehído/ β -feniletanol. En todos los casos sucede que el factor SO_2 afectó a todas las cepas de forma que una mayor concentración de SO_2 en el medio inicial produjo una mayor ratio aldehído/alcohol. Como se ha comentado en el apartado anterior, estos tres aldehídos son los que mayor constante de formación de α -hidroxialquilsulfonatos presentan y por tanto parece que el aldehído, intermedio en la formación del alcohol, se está quedando formando aductos con el SO_2 en lugar de terminar su reducción hasta el alcohol. Como se ha comentado en el apartado 1.3.1, el metional y el fenilacetaldehído son los aldehídos del estudio que más fácilmente pueden afectar al aroma del vino por sus bajos umbrales de olfacción, y por tanto el hecho de que se forme en proporción más aldehído que alcohol puede tener una doble repercusión aromática: 1) aunque inicialmente los aductos con el SO_2 son inodoros, ya se quedan presentes en el vino provocando notas sensoriales negativas si llegaran a oxidarse, 2) mientras que la formación de metionol y β -feniletanol no tendrían apenas importancia sensorial (de la Fuente Blanco, Sáenz-Navajas & Ferreira, 2016).

Además, vemos como el factor cepa afecta tanto a las ratios metional/metionol como isobutanol/isobutanol. Para el primero, la cepa *Merit* fue la que presentó una mayor ratio, y aunque las otras dos cepas obtuvieran valores significativamente inferiores fueron más elevados que para el resto de los aldehídos, donde se quedan con ratios inferiores a 0,5; otro signo de la importancia de este compuesto en el aroma del vino. Para la ratio isobutanol/isobutanol destaca cómo *Fermicru* se coloca como la cepa que más isobutanol acumuló en relación al isobutanol. Este hecho resulta curioso ya que *Merit* resultó ser la cepa que mayor concentración presentaba de isobutanol, pero también lo hacía de isobutanol, lo que puede ser un indicativo de una elevada eficiencia de esta cepa hacia la degradación de la valina por la Ruta de Ehrlich.

Observando el efecto cepa en la formación de alcoholes, aldehídos y de su ratio, *QA23* aparece como una opción muy interesante. Esta cepa obtuvo los menores valores de metional e isobutanol y los segundos más elevados de isobutanol. Con lo cual sus ratios de metional/metionol e isobutanol/isobutanol son de los más bajos. La implicación sensorial de esta cepa es doble. En comparación a las otras dos cepas estudiadas presentará menos posibles problemas de oxidación en cuanto a la liberación del metional y además su elevado contenido en isobutanol podría proporcionar aromas frutales (de la Fuente Blanco, Sáenz-Navajas & Ferreira, 2016). En conclusión, este hecho invita a aumentar el número de cepas a estudiar.

Finalmente, resulta determinante para la ratio 2-metilbutanal/2-metilbutanol la interacción entre los factores cepa y $\text{SO}_{2\text{dopado}}$, que se refleja en cómo el SO_2 afecta de diferente manera a las cepas encontrándose tres comportamientos diferentes: sin diferencias significativas para las ratios de *Fermicru*, con un aumento significativo ($p < 0,05$) de la ratio en las muestras de *Merit* con SO_2 inicial, y una discriminación significativa ($p < 0,05$) en las *QA23* con SO_2 inicial. Sin embargo, el resultado de *QA23* debe ser tratado con cuidado, puesto que las determinaciones de 2-metilbutanol y 2-metilbutanal en las muestras dopadas con SO_2 inicialmente poseen desviaciones mayores del 20%.

Conclusiones

Actualmente el vino está establecido como una de las bebidas más consumidas en todo el mundo, resultando atractivo no únicamente por sus características sensoriales, sino también por beneficios en la salud que pueden suponer un consumo moderado de éste. La elevada producción de vino hace que sea fundamental el estudio y la mejora de su calidad sensorial, la cual se ve notablemente influenciada por el perfil aromático de éste. Uno de los desafíos acerca de la mejora del aroma del vino es el de intentar comprender la principal fuente de los aldehídos de Strecker que son los principales causantes de problemas aromáticos durante el envejecimiento.

Al realizar la fermentación alcohólica de un mosto sintético de composición controlada se ha podido valorar el impacto de factores como la cepa o el SO₂ inicial en la fermentación, que en consonancia con estudios previos, han tenido importancia en aspectos como la cinética de fermentación, la acidez volátil o las cantidades de SO₂ al terminar la fermentación. También nos ha permitido averiguar que la principal fuente de estos aldehídos es la Ruta de Ehrlich, pues se producen concentraciones de aldehídos semejantes a las encontradas en vinos comerciales, con la excepción del fenilacetaldehído, en un medio en el que por falta de polifenoles y de oxígeno, quedan descartadas otras rutas.

Los análisis de aldehídos se llevaron a cabo mediante un procedimiento de formación de oximas mediante su derivatización con PFBHA y su posterior análisis en GC-Q-MS, mientras que el análisis de alcoholes consistió en un procedimiento de microextracción líquido-líquido con CH₂Cl₂ para ser analizado por GC-IT-MS.

El estudio de cómo afecta cada factor a la ratio aldehído/alcohol ha resultado un aspecto de gran interés ya que puede conducir a permitir escoger condiciones de fermentación que lleven a la disminución de la concentración de aldehídos, minimizando en la medida de lo posible los problemas de envejecimiento asociados a su liberación por la reversibilidad de los α -hidroxialquilsulfonatos, y maximizando la formación de alcoholes. Sin embargo, es un parámetro que debe analizarse a la vez que las concentraciones absolutas de cada aldehído, ya que aunque se consigan menores ratios, podrían conseguirse todavía mejores resultados con cepas de levadura capaces de formar cantidades inferiores de aldehídos, lo que invita a ampliar el estudio a un mayor número de cepas.

Bibliografía

- Äyräpää, T. (1968). "Formation of Higher Alcohols by Various Yeasts". *Journal of the Institute of Brewing*, 74(2), pp. 169-178 DOI: 10.1002/j.2050-0416.1968.tb03111.x.
- Beal, A. y Mottram, D.S. (1994). "Compounds contributing to the characteristic aroma of malted barley". *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 42(12), pp. 2880-2884 DOI: 10.1021/jf00048a043.
- Bely, M., Rinaldi, A. y Dubourdieu, D. (2003). "Influence of Assimilable Nitrogen on Volatile Acidity Production by *Saccharomyces cerevisiae* during High Sugar Fermentation". *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 96(6), pp. 507-512 DOI: 10.1263/jbb.96.507.
- Bely, M., Sablayrolles, J.M. y Barre, P. (1990). "Description of Alcoholic Fermentation Kinetics: Its Variability and Significance". *American Journal of Enology and Viticulture*, 41(4), pp. 319-324.
- Blondin, B. (2014). *SO2 Production by Wine Yeast During Alcoholic Fermentation*. Informe científico. Edwardstown: Lallemand Australia Pty Ltd., Australia
- Bueno, M., Culleré, L., Cacho, J. y Ferreira, V. (2010). "Chemical and sensory characterization of oxidative behavior in different wines". *Food Research International*, 43(5), pp. 1423-1428 DOI: 10.1016/j.foodres.2010.04.003.
- Bueno, M., Zapata, J. y Ferreira, V. (2014). "Simultaneous determination of free and bonded forms of odor-active carbonyls in wine using a headspace solid phase microextraction strategy". *Journal of Chromatography A*, 1369(1), pp. 33-42 DOI: 10.1016/j.chroma.2014.10.004.
- Bueno, M. (2015) *Estrategias analíticas para la determinación de compuestos carbonílicos. Nuevos avances en la comprensión de los procesos de oxidación en carne de cordero y vino*. Tesis Doctoral, Universidad de Zaragoza, España.
- Bueno, M., Carrascón, V. y Ferreira, V. (2016). "Release and Formation of Oxidation-Related Aldehydes during Wine Oxidation". *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 64(3), pp. 608-617 DOI: 10.1021/acs.jafc.5b04634.

Carrascón, V., Vallverdú-Queralt, A., Meudec, E., Sommerer, N., Fernandez-Zurbano, P. y Ferreira, V. (2018). "The kinetics of oxygen and SO₂ consumption by red wines. What do they tell about oxidation mechanisms and about changes in wine composition?". *Food Chemistry*, 241(1), pp. 206-214 DOI: 10.1016/j.foodchem.2017.08.090.

Castejón-Musulén, O., Bueno, M., Ontañón, I., Marrufo-Curtido, A., Aragón-Capone, A.M., López, R. y Ferreira, V. "Determination of total Strecker aldehydes by direct derivatization in wine" En preparación.

Celestino Pérez, S. y Blánquez Pérez, J. (2007). "Origen y desarrollo del cultivo del vino en el Mediterráneo: La península Ibérica". *Universum. Revista de Humanidades y Ciencias Sociales*, 22(1), pp. 32-40 DOI: 10.4067/S0718-23762007000100004.

Chen, E.C. (1978). "The Relative Contribution of Ehrlich and Biosynthetic Pathways to the Formation of Fusel Alcohols". *Journal of the American Society of Brewing Chemists*, 36(1), pp. 39-43 DOI: 10.1094/ASBCJ-36-0039.

Chirumbolo, S. y Bjørklund, G. (2016). "Commentary: Sulfur Dioxide Contributes to the Cardiac and Mitochondrial Dysfunction in Rats". *Frontiers in cardiovascular medicine*, 3(15), pp. 1-3 DOI: 10.3389/fcvm.2016.00015.

Coote, N. y Kirsop, B.H. (1974). "The Content of Some Organic Acids in Beer and Other Fermented Media". *Journal of the Institute of Brewing*, 80(5), pp. 474-483 DOI: 10.1002/j.2050-0416.1974.tb06797.x.

Culleré, L., Cacho, J. y Ferreira, V. (2007). "An Assessment of the Role Played by Some Oxidation-Related Aldehydes in Wine Aroma". *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55(3), pp. 876-881 DOI: 10.1021/jf062432k.

Culleré, L., López, R. y Ferreira, V. (2019). "The Instrumental Analysis of Aroma-Active Compounds for Explaining the Flavor of Red Wines". En: *Red Wine Technology*. Elsevier Inc, pp. 283-307.

de Azevedo, L.C., Reis, M.M., Motta, L.F., da Rocha, G.O., Silva, L.A. y de Andrade, J.B. (2007). "Evaluation of the Formation and Stability of Hydroxyalkylsulfonic Acids in Wines". *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55(21), pp. 8670-8680 DOI: 10.1021/jf0709653.

de-la-Fuente-Blanco, A., Sáenz-Navajas, M.P. y Ferreira, V. (2016). "On the effects of higher alcohols on red wine aroma". *Food Chemistry*, 210(1), pp. 107-114 DOI: 10.1016/j.foodchem.2016.04.021.

- Deng, C. y Zhang, X. (2004). "A simple, rapid and sensitive method for determination of aldehydes in human blood by gas chromatography/mass spectrometry and solid-phase microextraction with on-fiber derivatization". *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 18(15), pp. 1715-1720 DOI: 10.1002/rcm.1544.
- Dickinson, J.R., Salgado, L.E.J. y Hewlins, M.J.E. (2003). "The Catabolism of Amino Acids to Long Chain and Complex Alcohols in *Saccharomyces cerevisiae*". *Journal of Biological Chemistry*, 278(10), pp. 8028 DOI: 10.1074/jbc.M211914200.
- Divol, B., du Toit, M. y Duckitt, E. (2012). "Surviving in the presence of sulphur dioxide: strategies developed by wine yeasts". *Applied Microbiology and Biotechnology*, 95(3), pp. 601-613 DOI: 10.1007/s00253-012-4186-x.
- Ehrlich, F. (1907). "Über das natürliche Isomere des Leucins". *Berichte der deutschen chemischen Gesellschaft*, 40(2), pp. 2538-2562 DOI: 10.1002/cber.190704002181.
- Escudero, A., Hernández-Orte, P., Cacho, J. y Ferreira, V. (2000). "Clues about the Role of Methional As Character Impact Odorant of Some Oxidized Wines". *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48(9), pp. 4268-4272 DOI: 10.1021/jf991177j.
- Ferreira, V., Bueno, M., Franco-Luesma, E., Culleré, L. y Fernández-Zurbano, P. (2014). "Key Changes in Wine Aroma Active Compounds during Bottle Storage of Spanish Red Wines under Different Oxygen Levels". *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 62(41), pp. 10015-10027 DOI: 10.1021/jf503089u.
- García Barceló, J. (1976). *Metodología de Análisis de Vinos y Derivados*. (1st ed.) Vilafranca del Penedés: SEPSA.
- Grant-Preece, P., Fang, H., Schmidtke, L.M. y Clark, A.C. (2013). "Sensorially important aldehyde production from amino acids in model wine systems: Impact of ascorbic acid, erythorbic acid, glutathione and sulphur dioxide". *Food Chemistry*, 141(1), pp. 304-312 DOI: 10.1016/j.foodchem.2013.02.100.
- Guerrero, R.F. y Cantos-Villar, E. (2015a). "Demonstrating the efficiency of sulphur dioxide replacements in wine: A parameter review". *Trends in Food Science & Technology*, 42(1), pp. 27-43 DOI: 10.1016/j.tifs.2014.11.004.

- Giudici, P., Zambonelli, C. y Romano, P. (1990). "A biometric study of higher alcohol production in *Saccharomyces cerevisiae*". *Canadian Journal of Microbiology*, 36(1), pp. 61-64 DOI: 10.1139/m90-012.
- Hailman, J.R. (2006). *Thomas Jefferson on wine*. University Press of Mississippi; pp. 3.
- Hazlitt, W. (1852). *The Life of Napoleon Buonaparte Volume 3*. (2nd ed.) Londres: Office of the Illustrated London Library.
- Hernandez-Orte, P., Bely, M., Cacho, J. y Ferreira, V. (2006). "Impact of ammonium additions on volatile acidity, ethanol, and aromatic compound production by different *Saccharomyces cerevisiae* strains during fermentation in controlled synthetic media". *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 12(2), pp. 150-160 DOI: 10.1111/j.1755-0238.2006.tb00055.x.
- Ho, C.T., Zheng, X. y Li, S. (2015). "Tea aroma formation". *Food Science and Human Wellness*, 4(1), pp. 9-27 DOI: 10.1016/j.fshw.2015.04.001.
- Jackson, R.S. (2020). *Wine Science*. (5th ed.) San Diego: Academic Press, pp. 237.
- Johnson, H. (1989). *Vintage: the story of wine*. New York: Simon & Schuster; pp. 35-46.
- Jouanna, J. (2012). "Wine and Medicine in Ancient Greece". En: *Greek Medicine from Hippocrates to Galen, Studies in Ancient Medicine, vol 40*. Brill Academic Pub, pp. 174-193.
- Kłosowski, G., Mikulski, D., Macko, D., Miklaszewska, B. y Kotarska, K. (2015). "Influence of various yeast strains and selected starchy raw materials on production of higher alcohols during the alcoholic fermentation process". *European Food Research and Technology*, 240(1), pp. 233-242 DOI: 10.1007/s00217-014-2323-8.
- Leikert, J.F., Räthel, T.R., Wohlfart, P., Cheynier, V., Vollmar, A.M. y Dirsch, V.M. (2002). "Red wine polyphenols enhance endothelial nitric oxide synthase expression and subsequent nitric oxide release from endothelial cells". *Circulation*, 106(13), pp. 1614-1617 DOI:10.1161/01.CIR.0000034445.31543.43.
- Liu, K.K. (2013). *Craft Cocktails at Home: Offbeat Techniques, Contemporary Crowd-Pleasers, and Classics Hacked with Science*. (1st ed.) Kevin Liu.
- Lurton, L., Snakkers, G., Roulland, C., Galy, B. y Versavaud, A. (1995). "Influence of the fermentation yeast strain on the composition of wine spirits". *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 67(4), pp. 485-491 DOI: 10.1002/jsfa.2740670410.

Mack, G.R. y Surina, A. (2005). *Food Culture in Russia and Central Asia*. (Ken Albala ed.) Greenwood Press.

Middleton Jr, E., Kandaswami, E. y Theoharides, T.C. (2000). "The Effects of Plant Flavonoids on Mammalian Cells: Implications for Inflammation, Heart Disease, and Cancer". *Pharmacological Reviews*, 52(4), pp. 673-751.

Miranda-Castilleja, D.E., Ortiz-Barrera, E., Arvizu-Medrano, S.M., Ramiro-Pacheco, J., Aldrete-Tápia, J.A. y Martínez-Peniche, R.Á (2015). "Aislamiento, selección e identificación de levaduras *Saccharomyces* spp. nativas de viñedos en Querétaro, México". *Agrociencia*, 49(7), pp. 759-773.

Moore, J.E.A., Forrester, L.J. y Pelosi, P. (1976). "Specific Anosmia to Isobutylaldehyde: the Malty Primary Odor". *Chemical Senses*, 2(1), pp. 17-25 DOI: 10.1093/chemse/2.1.17.

Moreira, N. y Guedes de Pinho, P. (2011). "Port Wine". En: Jackson, R.S. (Eds.). *Advances in Food Nutrition and Research volume 63. Speciality wines*. Elsevier, pp. 119-143.

Morgan, S.C., Haggerty, J.J., Johnston, B., Jiranek, V. y Durall, D.M. (2019). "Response to Sulfur Dioxide Addition by Two Commercial *Saccharomyces cerevisiae* Strains". *Fermentation*, 5(3), pp. 69-89 DOI: 10.3390/fermentation5030069.

Murray, M.A. (1999). "Wine Production and Consumption in Pharaonic Egypt". En: Van der Veen, M. (Eds.). *The Exploitation of Plant Resources in Ancient Africa*. Boston, MA: Springer, pp. 149.

Nadai, C., Treu, L., Campanaro, S., Giacomini, A. y Corich, V. (2016). "Different mechanisms of resistance modulate sulfite tolerance in wine yeasts". *Applied Microbiology and Biotechnology*, 100(2), pp. 797-813 DOI: 10.1007/s00253-015-7169-x.

Negoias, S., Visschers, R., Boelrijk, A. y Hummel, T. (2008). "New ways to understand aroma perception". *Food Chemistry*, 108(4), pp. 1247-1254 DOI: 10.1016/j.foodchem.2007.08.030.

Nikolantonaki, M. y Waterhouse, A.L. (2012). "A Method To Quantify Quinone Reaction Rates with Wine Relevant Nucleophiles: A Key to the Understanding of Oxidative Loss of Varietal Thiols". *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60(34), pp. 8484-8491 DOI: 10.1021/jf302017j.

Nonier Bourden, M.F., Vivas, N., Absalon, C., Vitry, C., Fouquet, E. y Vivas de Gaulejac, N. (2008). "Structural diversity of nucleophilic adducts from flavanols and oak wood aldehydes". *Food Chemistry*, 107(4), pp. 1494-1505 DOI: 10.1016/j.foodchem.2007.10.012.

Organización Internacional de la Viña y el Vino (2009) *Compendium of International Methods of Wine and Must Analysis-Sulfur Dioxide (Resolution Oeno 377/2009)*. Informe científico. París: OIV.

Organización Internacional de la Viña y el Vino (2011) *Complementary Definitions Relating to Sugar Content (Resolutions Oeno 18/73, Eco 3/2003 & Oeno 415/2011)*. Informe científico. París: OIV.

Organización Internacional de la Viña y el Vino (2015). *Review document on sensory análisis of wine*; Informe científico. París: OIV.

Organización Internacional de la Viña y el Vino (2018). *OIV Statistical Report On World Vitiviniculture*. 2018 World Vitiviniculture Situation. Informe agroeconómico. París: OIV.

Organización Internacional de la Viña y el Vino (2019). *2019 Statistical Report on World Vitiviniculture*; Informe agroeconómico. París: OIV.

Organización Internacional de la Viña y el Vino (2020) *International Code of Oenological Practices 2020 Issue*. Informe científico. París: OIV.

Ortega, C., López, R., Cacho, J. y Ferreira, V. (2001). "Fast analysis of important wine volatile compounds: Development and validation of a new method based on gas chromatographic–flame ionisation detection analysis of dichloromethane microextracts". *Journal of Chromatography A*, 923(1), pp. 205-214 DOI: 10.1016/S0021-9673(01)00972-4.

Panreac Química (1983). *Productos derivados de la uva y similares: métodos oficiales de análisis*. Montcada i Reixac: Montplet & Esteban.

Patel, S. y Shibamoto, T. (2002). "Effect of Different Strains of *Saccharomyces cerevisiae* on Production of Volatiles in Napa Gamay Wine and Petite Sirah Wine". *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(20), pp. 5649-5653 DOI: 10.1021/jf020337f.

Perpète, P. y Collin, S. (2000). "How to improve the enzymatic warty flavour reduction in a cold contact fermentation". *Food Chemistry*, 70(4), pp. 457-462 DOI: 10.1016/S0308-8146(00)00111-4.

Pripis-Nicolau, L., de Revel, G., Bertrand, A. y Maujean, A. (2000). "Formation of Flavor Components by the Reaction of Amino Acid and Carbonyl Compounds in Mild Conditions". *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48(9), pp. 3761-3766 DOI: 10.1021/jf991024w.

Rainieri, S. y Pretorius, I. (2000). "Selection and improvement of wine yeast". *Annals of Microbiology*, 50(1), pp. 15-31.

Rankine, B.C. y Pocock, K.F. (1970). "Alkalimetric determination of sulphur dioxide in wine". *The Australian wine brewing and spirit review*, 88(8), pp. 40-44.

Reazin, G., Scales, H. y Andreasen, A. (1970). "Mechanism of major congener formation in alcoholic grain fermentations". *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 18(4), pp. 585-589 DOI: 10.1021/jf60170a002.

Reglamento Delegado (UE) n° 934/2019 de la Comisión, de 12 de marzo de 2019, por el que se completa el Reglamento (UE) n° 1308/2013 del Parlamento Europeo y del Consejo en lo que se refiere a las zonas vitícolas donde el grado alcohólico pueda verse incrementado, las prácticas enológicas autorizadas y las restricciones aplicables a la producción y conservación de los productos vitícolas, el porcentaje mínimo de alcohol para subproductos y la eliminación de estos, y la publicación de las fichas de la OIV. Diario Oficial de la Unión Europea, L 149/1, de 7 de junio de 2019.

Ristic, R., Danner, L., Johnson, T.E., Meiselman, H.L., Hoek, A.C., Jiranek, V. y Bastian, S.E.P. (2019). "Wine-related aromas for different seasons and occasions: Hedonic and emotional responses of wine consumers from Australia, UK and USA". *Food Quality and Preference*, 71, pp. 250-260 DOI: 10.1016/j.foodqual.2018.07.011.

Saijō, R. y Takeo, T. (1970). "The Formation of Aldehydes from Amino Acids by Tea Leaves Extracts". *Agricultural and Biological Chemistry*, 34(2), pp. 227-233 DOI: 10.1080/00021369.1970.10859602.

Salopek, P. (2015). *Ghost of the Vine*. Disponible en: <https://www.nationalgeographic.org/projects/out-of-edén-walk/articles/2015-04-ghost-of-the-vine/> [Consultado: Mar 18, 2020].

San Juan, F., Cacho, J., Ferreira, V. y Escudero, A. (2012). "Aroma Chemical Composition of Red Wines from Different Price Categories and Its Relationship to Quality". *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60(20), pp. 5045-5056 DOI: 10.1021/jf2050685.

Schonberg, A. y Moubacher, R. (1952). "The Strecker Degradation of α -Amino Acids". *Chemical Reviews*, 50(2), pp. 261-277 DOI: 10.1021/cr60156a002.

Schulthess, D. y Ettlinger, L. (1978). "Influence of the Concentration of Branched Chain Amino Acids on the Formation of Fusel Alcohols". *Journal of the Institute of Brewing*, 84(4), pp. 240-243 DOI: 10.1002/j.2050-0416.1978.tb03881.x.

Shepherd, G.M. (2006). "Smell images and the flavour system in the human brain". *Nature*, 444(7117), pp. 316-321 DOI: 10.1038/nature05405.

Silva Ferreira, A.C., Hogg, T. y Guedes de Pinho, P. (2003). "Identification of Key Odorants Related to the Typical Aroma of Oxidation-Spoiled White Wines". *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(5), pp. 1377-1381 DOI: 10.1021/jf025847o.

Spiteller, G., Kern, W. y Spiteller, P. (1999). "Investigation of aldehydic lipid peroxidation products by gas chromatography–mass spectrometry". *Journal of Chromatography A*, 843(1), pp. 29-98 DOI: 10.1016/S0021-9673(98)01078-4.

Standage, T. (2006). *La historia del mundo en seis tragos: De la cerveza de los faraones a la Coca-Cola*. (1st ed.) DEBATE.

Strecker, A. (1862). "Notiz über eine eigenthümliche Oxydation durch Alloxan". *Annalen der Chemie und Pharmacie*, 123(3), pp. 363-365 DOI: 10.1002/jlac.18621230312.

Styger, G., Prior, B. y Bauer, F. (2011). "Wine flavor and aroma". *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 38(9), pp. 1145-1159 DOI: 10.1007/s10295-011-1018-4.

Sun, A.Y., Wang, Q., Simonyi, A. y Sun, G.Y. (2008). "Botanical Phenolics and Brain Health". *NeuroMolecular Medicine*, 10(4), pp. 259-274 DOI: 10.1007/s12017-008-8052-z.

Sun, Y., Zhang, T., Lü, H., Yu, Z. y Li, X. (2016). "Effect of added sulphur dioxide levels on the fermentation characteristics of strawberry wine". *Journal of the Institute of Brewing*, 122(3), pp. 446-451 DOI: 10.1002/jib.342

Ugliano, M., Kwiatkowski, M.J., Travis, B., Francis, I.L., Waters, E.J., Herderich, M.J. y Pretorius, I.S. (2009). "Post-bottling management of oxygen to reduce off-flavour formation and optimise wine style". *Australian & New Zealand Wine Industry Journal*, 24(1), pp. 24-28.

Vilela-Moura, A., Schuller, D., Mendes-Faia, A. y Côte-Real, M. (2010). "Effects of acetic acid, ethanol, and SO₂ on the removal of volatile acidity from acidic wines by two *Saccharomyces cerevisiae* commercial strains". *Applied Microbiology and Biotechnology*, 87(4), pp. 1317-1326 DOI: 10.1007/s00253-010-2558-7.

Vivar-Quintana, A.M., Santos-Buelga, C., Francia-Aricha, E. y Rivas-Gonzalo, J.C. (1999). "Formation of anthocyanin-derived pigments in experimental red wines". *Food Science and Technology International*, 5(4), pp. 347-352 DOI: 10.1177/108201329900500407.

Webb, A.D. y Ingraham, J.L. (1963). "Fusel Oil". *Advances in Applied Microbiology*, 5(1), pp. 317-353.

Wildenrad, H.L. y Singleton, V.L. (1974). "The Production of Aldehydes as a Result of Oxidation of Polyphenolic Compounds and its Relation to Wine Aging". *American Journal of Enology and Viticulture*, 25(2), pp. 119.

Winkler, A.J., Cook, J.A., Kliwer, W.M. y Lider, L.A. (1974). *General viticulture*. (2nd ed) University of California Press.

Zapata, J., Mateo-Vivaracho, L., Cacho, J. y Ferreira, V. (2010). "Comparison of extraction techniques and mass spectrometric ionization modes in the analysis of wine volatile carbonyls". *Analytica Chimica Acta*, 660(1), pp. 197-205 DOI: 10.1016/j.aca.2009.09.041.

Zoecklein, B.W., Hackney, C.H., Duncan, S.E. y Marcy, J.E. (1999). "Effect of fermentation, aging and thermal storage on total glycosides, phenol-free glycosides and volatile compounds of White Riesling (*Vitis vinifera* L.) wines". *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 22(2), pp. 100-107 DOI: 10.1038/sj.jim.2900613.